

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Regulación de la expresión de la subunidad GluN1 del
receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e
isquemia cerebral**

TESIS DOCTORAL

Jorge Reoyo Rodríguez

Licenciado en Bioquímica

Directora:

Dra. Margarita Díaz-Guerra González

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid
CSIC-UAM

Dña. **Margarita Díaz-Guerra González**, Doctora en Ciencias e Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM).

CERTIFICA:

Que Don Jorge Reoyo Rodríguez, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título:

“Regulación de la expresión de la subunidad GluN1 del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral”

Supervisado el trabajo, considero que es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, con objeto de optar al título de Doctor en Neurociencia por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmo el presente certificado en,

Madrid, 12 de Noviembre de 2012

Fdo.: **Margarita Díaz-Guerra González**

Investigador Científico del CSIC
Profesora Honoraria Dpto. Bioquímica UAM

Agradecimientos

Haciendo examen de conciencia me he dado cuenta que esta es la parte de la tesis más difícil de escribir, si quieres que quede en condiciones claro. Por un lado, no quieres olvidarte de nadie, por otro, no sabes en que orden colocar a las personas a las que quieres agradecer tanto apoyo, por el hecho de no hacer de menos a nadie, ni ofender, y emplear las palabras correctas, etc, difícil cuanto menos. Con estos problemas, intentaré hacerlo lo mejor posible, que nadie se sienta ofendido. Que sepáis que se admiten quejas, seguiré estando algún tiempo en el labo 2.7!!!

En primer lugar me gustaría agradecer infinitamente a la **Dra. Díaz Guerra**, para mí “Marga”, por haberme permitido realizar esta tesis en el laboratorio y bajo su dirección. Todavía recuerdo como comenzó todo, con aquella entrevista de 10 minutos en el despacho y ella eligiendome entre varios candidatos para realizar el proyecto de fin de carrera, nunca imaginé que ese momento sería el principio de un gran final que por fin ha llegado. También, por portarse prácticamente como una madre y consentirme muchas cosas, que seguramente cualquier otro jefe no hubiera permitido. Por todo esto y por ser comprensiva, no desesperarse, confiar en mí a pesar de mis meteduras de pata en algunos momentos, y sobre todo, por tener tanta paciencia en la corrección de esta tesis, hacerme entender las cosas de manera correcta, y formarme como científico, MUCHAS GRACIAS!!!

A mis padres y mi hermana, creo que sobran las palabras para hablar de ellos. A mi **padre** por su preocupación, por estar siempre preguntando, aunque sepa que no me gusta, e interesándose por mi trabajo y mi futuro. A mi **madre** por estar pendiente de mí en todo momento durante la escritura en casa, por escucharme sentada en el sofá cada vez que iba a desahogarme, aunque no supiera ni de que le estaba hablando y, sinceramente, porque es mi madre y se lo merece. Y mi **hermana** porque, aún teniendo sus propias preocupaciones, siempre ha tenido un hueco para preguntarme y animarme.

Al resto de mi familia, ABUELAS, tíos, primos, por interesarse siempre, de un modo u otro, por mi trabajo y por mi tesis. A todos, GRACIAS!!!

A mis compañeros del labo 2.7., a los que están y a los que se han ido. De los que están: a **Sara Ayuso (Sarita)**, lo primero por ser compañera de batallas de labo desde hace tiempo, de desesperaciones (de alegrías también, claro), por escucharme y comprenderme, tanto en el terreno profesional como en el personal, darme buenos consejos, no es solo una compañera sino una amiga. A **Gonzalo**, por su ayuda en muchas ocasiones sobre todo en tema de ordenadores o cálculos, ¿qué hubiera hecho sin

tu ayuda?, por los momentos de risas y por ser un tío legal, aunque un poco reservado. A nuestro último fichaje, **Silvia**, porque aunque no te conozco mucho, sé que eres buena chica e incluso ya me has ayudado con experimentos y todo. Por último, a **Fabio**, que aunque no es del labo, pero como si lo fuera, por ser tan “pesadito” (sin que te moleste). De los que se marcharon: a **Sergio**, por ser mi antecesor, el que abrió fuego y el que me enseñó gran parte de las cosas que hoy en día sé. Por acogerme en el laboratorio desde el primer momento como si fuera uno más, por compartir conmigo su sabiduría y por acogerme en su casa en Alemania. A **Mónica Sobrado**, por no dejarme sólo ni un sólo momento desde el primer día, enseñarme a hacer tan bien las cosas, con tanto cuidado, cuando quizá no le correspondía, y por confiar en mí siempre. A **Óscar**, que voy a decir de él, que ha sido compañero, amigo, confidente, y que todavía en la distancia sigue estando ahí y preocupándose igual que el primer día. A **Sara González (Sarona, Saritísima)**, otra de mis madres en el laboratorio, por enseñarme que si uno quiere, puede, por tu coraje, tu fuerza, no solo compañerismo, sino amistad, que aún hoy sigue y seguirá, por esos eternos cafés en la mañana o en la tarde, tú sabes todo lo que te aprecio. A mi AMIGA **Ruth**, creo que unas “risas” resumen perfectamente todo lo que vivimos en el labo y fuera de él, y todo lo que seguiremos viviendo, por todo, no podría decir solo un par de cosas, ya sabes tú lo que significas para mí. A **Mónica Serrano**, una de nuestras “avanzadas”, por sus ratos de diversión, por no dejar que nunca nadie estuviera triste y por sacar siempre una sonrisa aún en momentos duros, por tus comentarios graciosos, por ser muy buena chica. A TODOS, GRAAACIAS!!!

Chicas del 2.4.2: encabezadas por **Teresa Iglesias**, gracias por la preocupación, por esos seminarios mixtos, esas discusiones científicas, y por animar siempre las reuniones y fiestas. A **Celia**, por ser buena compañera, preocuparse, implicarse en mi tesis a base de preguntas y sugerencias, y ofrecerme su ayuda en cada momento. A **Lucía Sánchez (dueña y señora del confocal del IIB, ahora)**, por estar siempre dispuesta a cualquier cosa, desde un café, una conversación, hasta un sarao de esos que tanto nos gustan. A **Andrea**, por ser “compi” de gym a tiempo parcial, y porque, aunque nunca se organice del todo bien, siempre saca tiempo para un café con el que desahogar la mañana o un rato agradable para no solo hablar de la tesis. A **Lucía García**, por ser “compi” de gym a tiempo completo, y por ser la alegría de la huerta, siempre con esa sonrisa característica que nunca se va de su cara, por preocuparte constantemente por la tesis y prestarme tu ayuda en todo. A **Sara Ramírez**, porque me has demostrado que eres buena gente, y muy constante en tu actitud hacia mí desde el primer día. Al resto de ex-compañeros de ese laboratorio, a los que siempre recordamos en nuestras conversaciones, **Irene, Vero, Sandra, Alonso**, (no sé si me dejo a alguien), GRACIAS A TODOS!!!

A la **Dra. Rodríguez Peña** por prestarnos amablemente su laboratorio para desempeñar nuestras labores y por compartir su conocimiento científico conmigo durante mis comienzos. GRACIAS!!!

A los chicos del laboratorio de **Miguel Campanero**, los que pasaron: **Josué, Irene, María**. Los que están: **Yuri y Raúl**. GRACIAS POR TODO!!!

A la **Dra. Pilar Gómez**, que muy amablemente accedió a ser mi tutora de tesis, y que tan amablemente me ha atendido y recibido siempre que se lo he solicitado sin poner ninguna pega. GRACIAS!!!

A todos mis compañeros de universidad que me han acompañado en este camino. Algunos ya han pasado por esto, otros están apunto. Gracias a todos por hacermelo más fácil, **Nadia** (AMIGA y confidente desde los inicios de la carrera, aún hoy muy presente en mi vida), **Cris Moreno** (que de risas tontas, recuerdas?), **Cris Ortega** (compañera de carrera y de doctorado, que bien lo hemos pasado), **Irene** (compañera de carrera y de tren muchos años camino al IIB), **Andrés** (compañero de colegio y de universidad de toda la vida, aún estando fuera de España, siempre has estado presente), **Jorge** (amigo desde los inicios de la carrera), en fin, todos ellos y más, **Alberto, Gustavo, Marta, Erika, Soraya**, y los que se me olvidan, GRACIAS A TODOS!!!

A mis AMIGOS DE TODA LA VIDA: **Alexandra, Erika, María, Tito**, ¿qué os voy a decir? Por estar siempre, siempre, siempre, siempre, desde hace tantísimo tiempo, incondicionales, habéis hecho que mi vida sea muy especial, sabéis que sois como mis hermanos, siempre os estaré agradecido. GRACIAS A TODOS!!!

No me olvido tampoco, ya que de una forma u otra han estado también ahí: **Ángela, Baldo, David**. También a los padres de mis amigos, que han sido como mis segundos padres. GRACIAS!!!

No quiero olvidarme de todos los servicios del IIB, microscopia, almacén, cocina, secuenciación, imagen, todos los que han aportado algo a esta tesis.

Resumiendo, por ese granito de arena que habéis aportado cada uno de vosotros con el que hemos formado esta montaña, por este camino que hemos recorrido juntos y que, por fin hoy, ve la luz.

GRACIAS A TODOS

Resumen

Los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs) son canales iónicos heteroméricos de gran importancia en el funcionamiento normal y patológico del SNC, en los que GluN1 es una subunidad obligatoria. Su estimulación en exceso da lugar a la muerte neuronal por excitotoxicidad que tiene un papel central en accidentes cerebrovasculares y también está asociada a otros daños agudos y crónicos del SN, como los que ocurren en enfermedades neurodegenerativas. Trabajos previos del grupo demostraron la represión de la transcripción del gen *glun1* en condiciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral. En esta tesis hemos utilizado modelos *in vitro* de excitotoxicidad y de isquemia cerebral para caracterizar en detalle los mecanismos de dicha regulación. Para ello, nos hemos apoyado en estudios *in silico*, generación y análisis de mutantes del promotor génico, sobre-expresión o interferencia génica de diversas proteínas reguladoras, experimentos de inmunoprecipitación de proteínas o cromatina (ChIP) y uso de inhibidores químicos. Hemos demostrado que la regulación de *glun1* está mediada fundamentalmente por dos elementos de respuesta MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y dos CREs (-343/-324 y -315/-296) de su promotor proximal, necesarios para su activación por concentraciones sub-tóxicas de agonista y su represión en condiciones de excitotoxicidad. La quinasa ERK5, activada por la vía BDNF/TrkB, tiene un papel central en la regulación basal de GluN1, principalmente a través de los elementos MEF2 anteriores. Sin embargo, en excitotoxicidad, pERK5 es inactivada por un mecanismo dependiente de la proteína-fosfatasa PP1 que participa en la inhibición de la transcripción de *glun1* probablemente por una disminución de la actividad de los factores de transcripción (FTs) MEF2 y CREB a la que también contribuirían su defosforilación por PP1 y la actividad de HDACs de clase III (sirtuínas). En fases más avanzadas del proceso de excitotoxicidad, la proteasa calpaína también participa en la represión de *glun1* mediante el procesamiento de MEF2A, MEF2D y CREB. Adicionalmente, el represor REST, con la participación obligada de HDAC1, inhibe la actividad del promotor *glun1* a través de los elementos CRE y MEF2 anteriores y RE1 (-150/-131), tanto en excitotoxicidad como de forma más atenuada en condiciones basales. Es relevante el aumento en los niveles de HDAC1 observado desde tiempos muy tempranos tras la inducción de excitotoxicidad *in vitro* o *in vivo*. Resultados preliminares sugieren la formación de un complejo DNA/proteína, que incluiría a los FTs pCREB y MEF2 asociados entre si reconociendo los elementos MEF2 y CRE del promotor de *glun1*. En excitotoxicidad, estos complejos estarían favorecidos e incorporarían la proteína HDAC1, que junto con REST inhibiría la transcripción de *glun1*. Los resultados anteriores, a través de la caracterización de la regulación del gen *glun1*, muestran como afecta la excitotoxicidad a la función de FTs clave para la expresión de genes implicados en la supervivencia neuronal que podrán ser investigados como posibles dianas de neuroprotección frente al daño isquémico.

Summary

The N-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors (NMDARs), are heteromeric ionic channels very important in physiological and pathological functioning of the NS where GluN1 is an obligatory subunit. Overactivation of NMDARs causes neuronal death due to excitotoxicity, a central process in stroke and also associated to other acute and chronic disorders such as neurodegenerative diseases. Previous work of our group demonstrated transcriptional repression of the *glun1* gene induced by excitotoxicity and cerebral ischemia. In this thesis, we have used models of *in vitro* excitotoxicity and brain ischemia to further characterize the mechanisms of this regulation. To this aim, we have performed *in silico* studies, generated and analyzed mutant promoters, over-expressed or genetically interfered different regulatory proteins, protein or chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays as well as analyzed the effect of different chemical inhibitors. So far, we have shown that two MEF2 response elements (-812/-789 and -2363/-2341) and two CREs (-343/-324 and -315/-296) present in the *glun1* proximal promoter are mostly responsible for this gene regulation. These sequences are both required for *glun1* activation induced by sub-toxic concentrations of agonist or repression in excitotoxic conditions. We have also demonstrated that ERK5, a kinase activated by the BDNF/Trk pathway, plays a major role in basal regulation of GluN1 mostly through the MEF2 motifs above mentioned. However, in excitotoxic conditions, pERK5 is inactivated by a protein-phosphatase PP1-dependent mechanism, which is involved in *glun1* transcriptional inhibition probably as a consequence of decreased activity of the transcription factors (TFs) MEF2 and CREB, helped by their inactivation by PP1 dephosphorylation or due to sirtuin activity. Later in the excitotoxic process, the protease calpain is also involved in *glun1* repression by means of MEF2A, MEF2D and CREB processing. Additionally, the gene repressor REST, with the mandatory participation of HDAC1, inhibits the activity of the *glun1* promoter through the CRE and MEF2 elements and also a RE1 motif (-150/-131), both in excitotoxic and, in an attenuated way, basal conditions. It is remarkable the increase observed very early after excitotoxicity induction in HDAC1 levels, both *in vitro* and *in vivo*. Preliminary results suggest the formation of a DNA/protein complex, comprising TFs MEF2 and pCREB, associated among them, interacting with the MEF2 and CRE motifs in *glun1* promoter. Upon excitotoxic stimulation, these complexes would be favoured and include HDAC1, which together with REST would inhibit *glun1* transcription. These results, by means of the characterization of *glun1* gene regulation, unveil how the function of key TFs controlling the expression of genes involved in neuronal survival is affected by excitotoxicity. These TFs might be investigated as novel targets for neuroprotection against ischemic damage.

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	21
<u>INTRODUCCIÓN</u>	27
1. El receptor de glutamato de tipo NMDA	30
1.1. Clasificación de los NMDARs dentro de la familia de receptores de glutamato	30
1.2. Propiedades y estructura del NMDAR	31
1.3. Expresión temporal y regional del NMDAR	34
1.4. Relevancia de los NMDARs para la supervivencia neuronal	35
2. La isquemia cerebral y la excitotoxicidad neuronal	38
2.1. Alteraciones patológicas en la función del NMDAR	40
2.2. Mecanismos de control de la expresión génica en excitotoxicidad e isquemia	43
2.3. Mecanismos responsables del papel dual de los NMDARs en la supervivencia y muerte neuronales	45
3. Regulación de la expresión de las subunidades GluN1 en condiciones fisiológicas y de excitotoxicidad	47
3.1. Identificación del promotor del gen <i>glun1</i>	47
3.2. Regulación de la transcripción de <i>glun1</i> durante el desarrollo y la diferenciación neuronal por elementos en <i>cis</i> y factores en <i>trans</i>	48
3.3. Producción de diferentes isoformas de GluN1 mediante procesamiento alternativo de su mRNA	49
3.4. Contribución de mecanismos postrancrpcionales a la expresión de GluN1	51
3.5. Regulación de la expresión de GluN1 asociada al proceso de excitotoxicidad	52
4. Proteínas reguladoras de la transcripción de <i>glun1</i>	54
4.1. CREB	54
4.2. MEF2	58
4.3. ERK5	62

Índice

4.4. REST	66
4.5. HDACs	69
<u>OBJETIVOS</u>	77
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	81
1. Reactivos	83
2. Tampones y soluciones	84
3. Anticuerpos	84
4. Cultivos celulares	86
4.1. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata	86
4.2. Cultivo de células HEK293T	87
4.3. Cultivo de células PC12	87
5. Modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis	87
6. Plásmidos y vectores lentivirales	88
7. Generación y titulación de lentivirus	91
8. Infección de cultivos primarios con lentivirus	92
9. Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo MTT	92
10. <i>Immunoblot</i>	93
11. Fraccionamiento subcelular	94
12. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	94
13. Inmunoprecipitación	95
14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	95
15. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>glun1</i>	96
16. Ensayo de la actividad de promotores	97
17. Análisis estadístico	97

RESULTADOS	99
1. Estudio de la regulación temprana de las subunidades GluN1 del NMDAR en un modelo de excitotoxicidad <i>in vitro</i>	101
2. Identificación <i>in silico</i> de elementos reguladores de la transcripción en la región promotora proximal del gen <i>glun1</i>	104
3. Identificación de los elementos CRE y MEF2 necesarios para la regulación del promotor del gen <i>glun1</i> en condiciones basales y de excitotoxicidad y análisis de sus posibles sinergias	106
3.1. Caracterización de la actividad del promotor de <i>glun1</i> en respuesta a la concentración de NMDA: posible regulación por elementos CRE y MEF2	106
3.2. Identificación de los elementos CRE y MEF2 participantes en la regulación del promotor de <i>glun1</i> en condiciones basales y de excitotoxicidad	109
3.3. Análisis de la posible interacción entre el FT CREB y los sitios MEF2 y CRE del promotor de <i>glun1</i>	112
4. Regulación de la expresión de GluN1 por modulación de la vía BDNF/TrkB/ERK5/MEF2	114
4.1. Caracterización de la inducción de la expresión de GluN1 por activación de la vía BDNF/TrkB/CREB	114
4.2. Estudio de la implicación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y de inducción por BDNF	117
4.3. Estudio de la implicación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad	120
5. Regulación de la actividad de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D en condiciones basales y de excitotoxicidad y su efecto sobre la expresión de GluN1	123

5.1. Estudio de la participación de la Ser/Thr fosfatasa PP1 en la regulación de ERK5, CREB, MEF2A y MEF2D	123
5.2. Análisis de la participación de la proteasa calpaína en la regulación de la expresión de GluN1 a través de los factores de transcripción CREB y MEF2	127
6. Regulación del promotor del gen <i>glun1</i> en condiciones basales y de excitotoxicidad por acción del represor transcripcional REST	130
6.1. Caracterización de la inducción de la expresión de REST en cultivos primarios corticales en condiciones de excitotoxicidad	130
6.2. Estudio de la participación de REST en la regulación de <i>glun1</i> a través de elementos de respuesta RE1, MEF2 y CRE de su promotor	132
7. Regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad a través de mecanismos epigenéticos mediados por HDACs	135
7.1. Efecto del tratamiento con nicotinamida sobre la regulación de <i>glun1</i> inducida en condiciones de excitotoxicidad: posible participación de HDACs de clase III	135
7.2. Participación de las HDACs de clase I y II en la regulación de GluN1	137
7.3. Caracterización de la expresión de HDAC1 y de su participación en la regulación del promotor GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad	138
8. Análisis de la participación conjunta de REST y HDAC1 en la regulación del promotor GluN1 en condiciones basales	143
9. Caracterización de la asociación de CREB, MEF2 y HDAC1 en condiciones basales y de excitotoxicidad	145
10. Estudio de la regulación de GluN1 y de las proteínas implicadas en su control transcripcional en un modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis	147

<u>DISCUSIÓN</u>	151
1. Identificación de los elementos CRE y MEF2 necesarios para la regulación de <i>glun1</i> en condiciones basales y de excitotoxicidad	153
2. Regulación de la expresión de GluN1 por modulación de la vía BDNF/TrkB/ERK5/MEF2	155
3. Regulación negativa de GluN1 mediada por REST y distintas clases de HDACs, principalmente HDAC1	157
4. Regulación de GluN1, y de las proteínas MEF2, CREB y ERK5, por mecanismos no transcripcionales	162
5. Regulación de GluN1, y las proteínas que participan en su regulación, en un modelo de isquemia focal por fototrombosis	168
<u>CONCLUSIONES</u>	171
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	177

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos	CRE: <i>cAMP/calcium response element</i>
AID: <i>activity-regulated inhibitors of death</i>	CREB: <i>cAMP/calcium response element-binding protein</i>
AKT: <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	CREM: <i>cAMP/response element modulator</i>
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato	CRTCs: <i>CREB-regulated transcription coactivators</i>
AMPA: receptor de glutamato de tipo AMPA	DIV: día <i>in vitro</i>
AraC: citosina β -D-arabinofuranósido	DMEM: <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
ATF-1: <i>activating transcription factor 1</i>	DRG: ganglios de la raíz dorsal
ATP: adenosin trifosfato	DsRed: proteína roja fluorescente
Bcl2: <i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>	DTT: ditioneitol
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	ECV: enfermedad cerebrovascular
BMK1: <i>big MAPK 1</i>	EDTA: ácido etilendiaminotetracético
bHLH: <i>basic helix-loop-helix</i>	EGTA: ácido etilen-bis (oxietileno nitrilo) tetracético
bZIP: <i>basic leucine zipper domain</i>	Egr1-3: <i>early growth response-1-3</i>
CaMKII: proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina	EgrRE: <i>Egr response element</i>
CaN: calcineurina o proteína-fosfatasa 2B (PP2B)	ERK5: <i>extracellular signal-regulated kinase 5</i>
CBP: <i>CREB-binding protein</i>	FBS: suero fetal bovino
Cdk 5: quinasa dependiente de ciclina 5	FOXO: <i>forkhead box O</i>
ChIP: inmunoprecipitación de cromatina	FSC: flujo sanguíneo cerebral
CiIII: inhibidor III de la calpaína	FT: factor de transcripción
Clca1: regulador del canal de cloro Ca^{2+} -dependiente 1	GFP: proteína verde fluorescente
CMV: citomegalovirus	GluN1: subunidad del NMDAR de tipo 1
CoREST: <i>corepressor response element 1-silencing transcription factor</i>	GluN2: subunidad del NMDAR de tipo 2
	GluN3: subunidad del NMDAR de tipo 3
	GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3 β

Abreviaturas

HDAC: histona deacetilasa

HS: suero de caballo

IB: *immunoblot*

ICER: *inducible cAMP early repressor*

IF: inmunofluorescencia

iGluR: receptor ionotrópico de glutamato

IP: inmunoprecipitación

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KAR: receptor de glutamato de tipo kainato

KID: *kinase-inducible domain*

Kidins220/ARMS: *kinase D-interacting substrate of 220kDa/Ankyrin repeat-rich membrane spanning*

KO: *knockout*

lncRNAs: RNAs no codificantes largos

LTD: depresión a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

LV: lentivirus

MADS: *MCM1-agamous-deficiens-serum response factor*

MAPK/ERK: *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase*

MAZ: *Myc-associated zinc finger protein*

MCAO: oclusión de la arteria cerebral media

MEF2: **myocyte enhancer factor-2**

MEK: *MAPK kinase/Erk kinase*

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato

mHtt: *mutant Huntingtin*

miRNAs: microRNAs

MS-275: entinostato

MTT: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NAM: nicotinamida

ncRNAs: RNA no codificante

NCX: intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NES: *nuclear export sequences*

NeuN: proteína nuclear neuronal

NFAT: *nuclear factor of activated T-cells*

NFκB: *nuclear factor kappa- B*

NGF: factor de crecimiento nervioso

NLS: secuencia de localización nuclear

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: receptor de glutamato de tipo NMDA

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NRSE: *neuron-restrictive silencing element*

NRSF: *neuron-restrictive silencer factor*

NSE: enolasa específica neuronal

NTD: dominio N-terminal

PDZ: *Postsynaptic density-95/ Disc large/ Zona occludens*

PGC-1α: *peroxisome proliferator activated receptor-γ coactivator 1α*

PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*

PKA: proteína quinasa A

PKB: proteína quinasa B

PKC: proteína quinasa C	Sp: <i>specificity protein</i>
PLA2: fosfolipasa A ₂	SCP1: <i>small C terminal domain phosphatase</i>
PLCγ: fosfolipasa Cγ	SUMO: <i>small ubiquitin-like modifier</i>
PP1: <i>protein phosphatase 1</i>	TAD: dominio de activación transcripcional
PP2A: <i>protein phosphatase 2A</i>	TAFII130/135: <i>TATA-binding protein-associated factor II 130/135</i>
PSD: densidad postsináptica	TLS: <i>translocated in sarcoma</i>
PSD-95: <i>postsynaptic density-95 protein</i>	TM: dominio transmembrana
Rcan: <i>regulator of calcineurin</i>	TORCs: <i>transducers of regulated CREB activity</i>
RE: retículo endoplásmico	tPA: activador tisular del plasminógeno
RE1: <i>repressor element-1</i>	TrkB: <i>receptor tyrosine kinase B</i>
REST: <i>response element 1silencing transcription factor</i>	TrkB-FL: <i>TrkB full length</i>
rRNAs: RNAs ribosómicos	TrkB-T1: <i>TrkB truncated 1</i>
ROS: especies reactivas de oxígeno	tRNAs: RNAs de transferencia
RSK: <i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>	TSA: tricostatina A
SAHA: ácido hidroxámico de suberoilánilida	TSSs: <i>transcription start sites</i>
SAP90: <i>synaptic-associated protein 90</i>	TTC: trifeniltetrazolio
s.d.: <i>standard deviation</i>	UTR: <i>untranslated region</i>
SDF-1: <i>stromal cell-derived factor 1</i>	VDCC: canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
SDS: dodecil sulfato sódico	VPA: ácido valproico
s.e.m: <i>standard error of the mean</i>	WPRE: <i>woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>
SH3: <i>Src-homology 3</i>	
Sham: <i>sham-operated</i>	
SIK2: <i>salt-inducible kinase 2</i>	
siRNAs: RNAs interferentes pequeños	
SNC: sistema nervioso central	
snoRNAs: RNAs nucleolares pequeños	

INTRODUCCIÓN

Una de las áreas prioritarias de la investigación biomédica es el estudio de patologías de alta incidencia y prevalencia creciente en la población, consecuencia de los cambios demográficos y el incremento de las expectativas de vida. Entre ellas se encuentra la enfermedad cerebrovascular (ECV) o ictus, que consiste en la alteración transitoria o permanente del funcionamiento de una o varias regiones del encéfalo como consecuencia de un trastorno circulatorio cerebral. En el mundo, la ECV constituye un problema sociosanitario de primer orden ya que en el año 2011 fue la segunda causa de muerte mundial, según datos de la OMS (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html). En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística referidos al año 2010, las ECVs supusieron la primera causa de muerte entre las mujeres y la tercera en varones (<http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p417/&file=inebase>). Además, el ictus es el principal responsable de invalidez en adultos y la segunda causa de demencia tras la enfermedad de Alzheimer.

La consecuencia más importante de la ECV es el daño cerebral, resultado de una mezcla compleja de procesos entre los que juega un papel central la excitotoxicidad. Este proceso es desencadenado por la estimulación excesiva de los receptores de glutamato, fundamentalmente de tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs), y también está asociado a traumatismos agudos y diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ello, se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar drogas dirigidas a bloquear la excitotoxicidad mediante la inhibición de la función del NMDAR. Sin embargo, los fármacos desarrollados no han conseguido superar los ensayos clínicos para su uso en el tratamiento del ictus, fundamentalmente debido a la falta de selectividad para preservar las funciones fisiológicas del NMDAR.

Alternativamente, se podrían tratar de intervenir las cascadas de señalización activadas tras la sobreactivación del NMDAR que conducen al daño isquémico. Esta es precisamente una de las líneas de investigación del laboratorio en el que se ha desarrollado esta tesis: caracterizar en profundidad los mecanismos moleculares del proceso de excitotoxicidad para identificar dianas terapéuticas alternativas al propio NMDAR y generar nuevas herramientas de neuroprotección. El trabajo anterior de nuestro grupo (revisado en la sección 2.1.) ha permitido establecer cómo afecta la excitotoxicidad a la expresión de diversas proteínas relevantes en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal, como son los propios NMDARs y otras proteínas relacionadas física y funcionalmente con ellos (proteínas de andamiaje y señalización, y receptores de neurotrofinas). En el caso concreto de los NMDARs, hemos demostrado el procesamiento mediado por la proteasa calpaína de sus subunidades GluN2 (Gascon et al., 2008b) y la inhibición de la transcripción del gen codificante para la subunidad GluN1 (Gascon et al., 2005). Prosiguiendo estos estudios, el objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido caracterizar en detalle cuales son los mecanismos de la regulación

Introducción

transcripcional de *GluN1*, tanto en condiciones de supervivencia neuronal como una vez inducido el proceso de muerte por excitotoxicidad. Hemos utilizado mayoritariamente un modelo de excitotoxicidad *in vitro*, y nos hemos apoyado en estudios *in silico*, la generación de mutantes de la región promotora proximal de *glun1*, la sobre-expresión o interferencia génica de diversas proteínas reguladoras, experimentos de inmunoprecipitación de proteínas o de cromatina (ChIP) y el uso de inhibidores químicos. De esta forma, hemos podido identificar algunos de los factores de transcripción (FTs) que regulan la transcripción de *glun1*, tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad, y diversos mecanismos de regulación positiva y negativa de este gen que podrían ser utilizados para el diseño de nuevas herramientas de neuroprotección en isquemia.

1. El receptor de glutamato de tipo NMDA.

Los NMDARs juegan un papel preponderante en la función sináptica y comunicación neuronal del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, tanto durante el desarrollo como en su vida adulta (Mori and Mishina, 1995). Su importancia es debida a su participación en procesos críticos como el aprendizaje, la memoria, la plasticidad sináptica, la sinaptogénesis y la supervivencia neuronal, y también por su intervención en los mecanismos de excitotoxicidad (Choi et al., 1988; Hartley et al., 1993; Olney, 1986). Como veremos, los NMDARs tienen una naturaleza dual y están implicados tanto en vías de supervivencia como de muerte neuronal.

1.1. Clasificación de los NMDARs dentro de la familia de receptores de glutamato.

El L-glutamato es el principal aminoácido excitatorio en el SNC de vertebrados y media la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis excitatorias rápidas (Collingridge and Lester, 1989). Entre los receptores para este neurotransmisor existen dos familias, según el mecanismo de transmisión de la señal de activación:

- a. La familia de los receptores metabotrópicos (mGluRs): constituida por receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas. Se encargan de la modulación de la transmisión sináptica mediante la activación de cascadas de señalización intracelular dependientes de segundos mensajeros (Schoepp et al., 1990; Sugiyama et al., 1987).
- b. La familia de los receptores ionotrópicos (iGluRs): formada por canales iónicos acoplados a ligando. Son los responsables de la hiperpolarización y despolarización de la membrana plasmática neuronal en las sinapsis excitatorias. Se clasifican en base a su afinidad

selectiva por agonistas sintéticos y a sus características electrofisiológicas (Michaelis, 1998), distinguiéndose tres tipos:

- Receptores de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPArs).
- Receptores de tipo kainato (Yang et al.).
- Receptores de tipo NMDA (NMDARs).

Los AMPARs y KARs presentan cinéticas de activación rápida y son permeables a Na^+ , K^+ y, en menor medida, a Ca^{2+} (Hollmann and Heinemann, 1994). Los NMDARs poseen propiedades específicas que los diferencian del resto de iGluRs y que explicaremos en detalle a continuación.

1.2. Propiedades y estructura del NMDAR.

Los NMDARs son los receptores de glutamato más abundantes en el cerebro de mamíferos (Hollmann and Heinemann, 1994). Están situados principalmente en la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias (Jones and Baughman, 1991) y son fundamentales y necesarios en una gran variedad de procesos como la supervivencia y diferenciación neuronal, la actividad sináptica, el aprendizaje y la memoria. Son canales iónicos que tienen alta permeabilidad para el ión Ca^{2+} y son bloqueados por Mg^{2+} de manera dependiente de voltaje. Los NMDARs funcionan como detectores moleculares de coincidencia cuya activación requiere la unión de sus coagonistas, glutamato y glicina o D-serina, y la despolarización simultánea de la membrana neuronal (**Fig. 1**) (Hollmann and Heinemann, 1994). Estas propiedades como canales iónicos convierten a los NMDARs en esenciales para los fenómenos de plasticidad sináptica, como la depresión a largo plazo (*Long Term Depression*, LTD) y la potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation*, LTP), base fisiológica de los procesos de memoria y aprendizaje (Collingridge, 1987).

Los NMDARs funcionales son hetero-oligómeros constituidos por diferentes tipos de subunidades. Teniendo en cuenta su origen genético y su función, las subunidades del NMDAR se clasifican en tres tipos (Dingledine et al., 1999): GluN1, codificada por un único gen con 8 isoformas derivadas del procesamiento alternativo de su mRNA; GluN2, codificada por 4 genes que dan lugar a los distintos subtipos (GluN2A-D); y GluN3, codificado por 2 genes que dan lugar a los subtipos GluN3A y B. Esta nomenclatura es relativamente reciente y se introdujo con el fin de unificar la denominación de los diferentes tipos de canales iónicos acoplados a ligando (Collingridge et al., 2009).

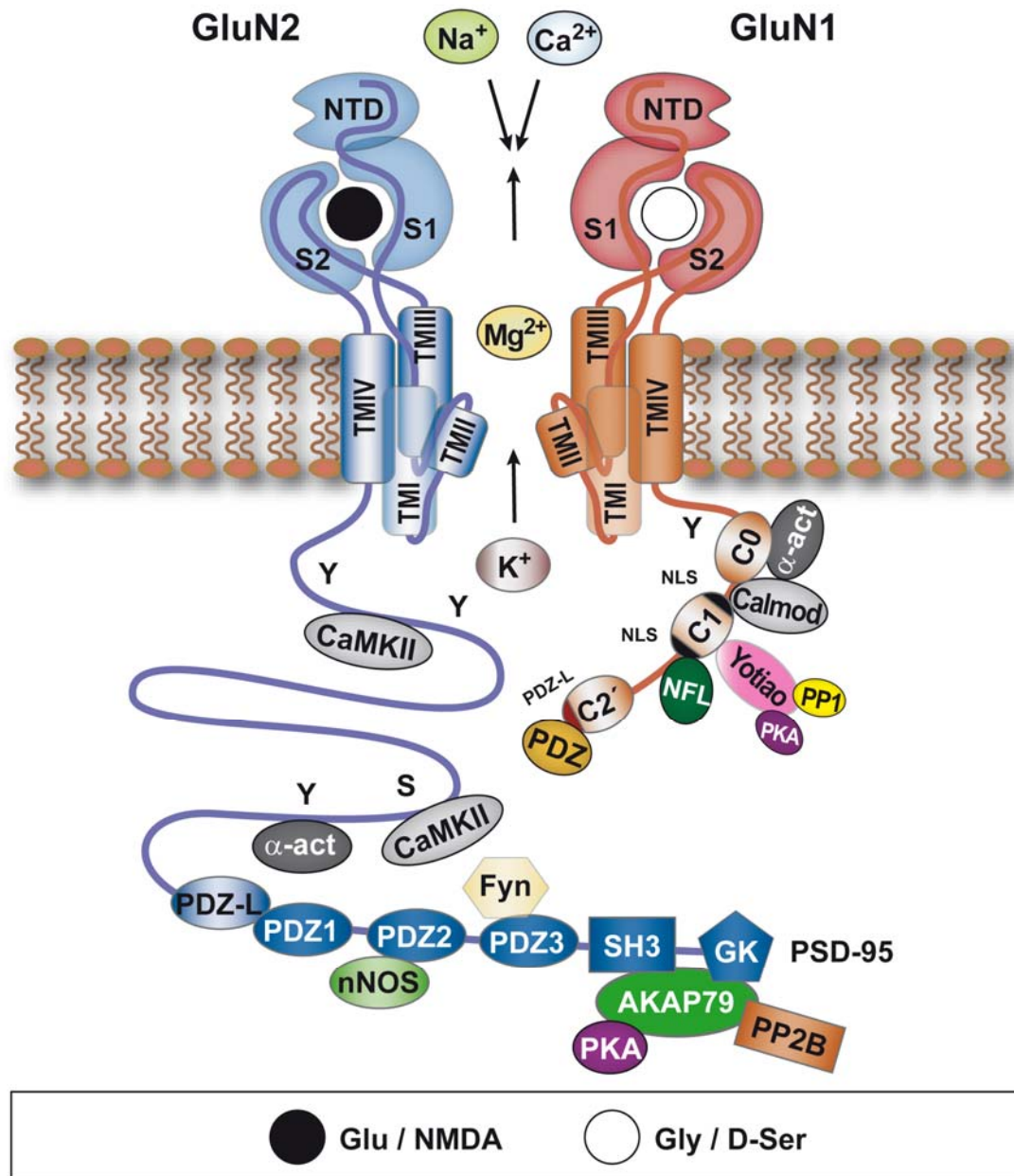


Figura 1. Dominios e interacciones proteicas establecidas por el NMDAR. Esquema general de los principales dominios de las subunidades GluN1 (rojo) y GluN2 (azul) del NMDAR y su topología en la membrana. En las secuencias extracelulares se distingue un dominio N-terminal (NTD), que contiene los sitios para la unión de moduladores de la actividad del NMDAR. Los 150 aminoácidos anteriores a la secuencia transmembrana TMI (dominio S1) y el bucle comprendido entre las TMIII y el TMIV (dominio S2) constituyen el sitio de interacción con el ligando: glutamato (o su agonista sintético NMDA) en subunidades de tipo GluN2, y glicina o D-serina en subunidades de tipo GluN1. Los cuatro dominios transmembrana forman un canal iónico permeable a Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , y sensible al bloqueo por Mg^{2+} . Los dominios C-terminales citoplasmáticos son de longitud variable y contienen numerosas regiones de unión a proteínas de señalización y andamiaje de la PSD. El dominio C-terminal de GluN1 es más corto pero complejo, y su estructura depende del procesamiento alternativo de los exones 21 y 22 que dan lugar a las unidades C1, C2 y C2', conteniendo también un dominio independiente, C0. En general, el dominio C0 interactúa con α -actinina (α -act) y calmodulina (Calmd), y el C1 interactúa también con calmodulina, neurofilamentos (NFL) y con la proteína Yotiao, que media a su vez la interacción de PKA y PP1. Además, posee una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita. El dominio C2' a través de sus tres aminoácidos C-terminales, que constituyen un ligando PDZ (PDZ-L), se une a proteínas de andamiaje de la familia PDZ. En el caso de las subunidades GluN2, el dominio C-terminal es una región larga y también compleja, con secuencias de unión a α -actinina y CaMKII, y múltiples sitios de fosforilación (indicados como Y y S). Las subunidades GluN2 poseen un PDZ-L C-terminal, implicado en la interacción con la proteína de andamiaje PSD-95. Esta última permite de forma indirecta la interacción del NMDAR con otras proteínas importantes como nNOS, Fyn o, a través de otras proteínas de andamiaje como AKAP79, PKA y PP2B. *Adaptada de:* (Lopez-Menendez. 2009).

Actualmente se acepta que el receptor funcional es un tetrámero constituido obligatoriamente por dos subunidades de tipo GluN1 y dos subunidades GluN2 (Schorge and Colquhoun, 2003), que forman receptores heterodiméricos cuando las dos subunidades GluN2 son iguales (ej: GluN1/GluN2A) o heterotriméricos si son diferentes (ej: GluN1/GluN2A/GluN2B). Esta diversidad en la composición del NMDAR tiene consecuencias funcionales importantes, ya que las propiedades electrofisiológicas del canal varían en función del tipo de subunidades que lo forman (Cathala et al., 2000; Hollmann and Heinemann, 1994). Hasta la fecha, se han identificado más de una docena de NMDARs funcionalmente diferentes en el SNC. Las subunidades de tipo GluN3 han sido menos estudiadas y se cree que podrían actuar como dominantes negativos de la actividad del receptor (Ciabarra et al., 1995; Das et al., 1998) ya que su presencia en los tetrámeros reduce la entrada de Ca^{2+} (Henson et al., 2010). De hecho, Roberts y colaboradores (2009) han demostrado que la expresión de GluN3A previene la estabilización y fortalecimiento prematuros de las sinapsis excitatorias durante el desarrollo postnatal. La regulación negativa de esta subunidad en estadios posteriores del desarrollo sería, por el contrario, un requisito imprescindible para la correcta maduración de las sinapsis y consolidación de la memoria (Roberts et al., 2009).

Las subunidades de los NMDARs poseen una estructura modular común a todos los miembros de la familia de los iGluRs, compuesta por una serie de regiones o dominios altamente conservados (**Fig. 1**). En la topología de GluN1 y GluN2 puede distinguirse un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión a ligando (S1S2), tres dominios transmembrana (TMI, TMIII y TMIV), un dominio en forma de horquilla (TMII) y un dominio C-terminal (Paas, 1998; Wo and Oswald, 1995). El NTD está orientado hacia el exterior celular y, en subunidades de tipo GluN2, actúa como sitio de unión de numerosos moduladores de la función del NMDAR (Masuko et al., 1999). Los 150 aminoácidos anteriores al TMI y la región en forma de bucle localizada entre el TMIII y el TMIV, constituyen el sitio de unión de los ligandos glutamato, o su análogo estructural NMDA, y glicina o D-serina, que deben unirse respectivamente a la subunidad GluN2 y GluN1 para activar al receptor. Los cuatro dominios transmembrana (TMI-TMIV) forman el canal iónico que, tras perder el bloqueo por Mg^{2+} , permite la entrada de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ (**Fig. 1**). El dominio en horquilla TMII atraviesa parcialmente la membrana plasmática (Kuner et al., 1996) y se dispone hacia el interior del canal, determinando la especificidad iónica y las propiedades electrofisiológicas del mismo (Bigge, 1999). Por último, el dominio C-terminal está orientado hacia el citoplasma y su longitud varía según el tipo de subunidad, siendo menor para las subunidades GluN1 que para las GluN2. Como veremos, contiene numerosas regiones de unión a proteínas de señalización y andamiaje de la densidad postsináptica (PSD, *postsynaptic density*) que, mediante estas interacciones, controlan la función y localización del NMDAR (Bolton et al., 2000).

1.3. Expresión temporal y regional del NMDAR.

La correcta formación y maduración del SNC a lo largo del desarrollo requiere mecanismos de regulación del patrón de expresión temporal y regional de las distintas subunidades del NMDARs, que dan lugar a variaciones en su composición y, por tanto, en su actividad (Perez-Otano and Ehlers, 2004). En cada neurona, la transcripción de los genes codificantes para las distintas subunidades del NMDAR está regulada de una forma coordinada. Adicionalmente, para que se mantenga la función celular fisiológica, la expresión de estas subunidades debe ser capaz de responder de manera diferencial al tipo celular, el estadio del desarrollo y las señales ambientales. Lógicamente, existe un gran interés en establecer los mecanismos de esta regulación coordinada y la manera en que se altera en condiciones patológicas.

La expresión de la subunidad obligatoria GluN1 es prácticamente ubicua en el SNC y comienza a detectarse en cerebro de rata a partir del día 14 del desarrollo embrionario hasta alcanzar niveles estables a las 3 semanas del nacimiento (Laurie and Seeburg, 1994). Los mecanismos de regulación de la expresión de esta subunidad serán abordados en detalle en la sección 3 de esta introducción). Por el contrario, las distintas subunidades GluN2 se caracterizan por tener una expresión temporal y regional muy diferente. Antes del nacimiento, los NMDARs están compuestos exclusivamente por subunidades de tipo GluN2B y GluN2D, ya que la expresión de GluN2A y GluN2C comienza en etapas postnatales del desarrollo (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1993). Las subunidades GluN2A y GluN2B se expresan principalmente en el prosencéfalo, en hipocampo y corteza mayoritariamente, mientras que GluN2C y GluN2D se localizan en cerebro medio y cerebelo (Monyer et al., 1994; Monyer et al., 1992). El hecho de que distintas subunidades GluN2 puedan coexpresarse no sólo en una misma región del SNC, sino también dentro de una misma célula, permite el ensamblaje de NMDARs heterotriméricos y es, como dijimos, fuente de una gran diversidad funcional (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

Cabe destacar que la composición del NMDAR también varía en función de su localización específica dentro de la membrana celular. En neuronas maduras, GluN2A se localiza predominantemente en la sinapsis (Monyer et al., 1994), mientras que GluN2B lo hace preferentemente en zonas extrasinápticas (Li et al., 1998; Rumbaugh and Vicini, 1999). Además, dicha expresión diferencial podría afectar significativamente a las propiedades funcionales de la respuesta excitatoria (Rumbaugh and Vicini, 1999). Sin embargo, las subunidades GluN2A y GluN2B no están confinadas o excluidas de la sinapsis, respectivamente, sino que ambas proteínas pueden encontrarse tanto en compartimentos sinápticos como extrasinápticos (Thomas et al., 2006). Recientemente, Papouin et al. (2012) han demostrado que D-serina y glicina son coagonistas endógenos del NMDAR aunque actuando en subpoblaciones diferentes del mismo, siendo el primero

el coagonista de los NMDARs sinápticos y el segundo de los extrasinápticos (**Fig. 2A**). Adicionalmente, han propuesto que estos coagonistas afectan de manera diferencial al tráfico de los subtipos de NMDARs hacia la membrana, contribuyendo a la segregación espacial mencionada anteriormente de los NMDARs formados por subunidades GluN2A y GluN2B entre posiciones sinápticas y extrasinápticas (Papouin et al., 2012).

1.4. Relevancia de los NMDARs para la supervivencia neuronal.

La activación fisiológica de los NMDARs es esencial para diversos procesos del SNC, uno de ellos la promoción de la supervivencia neuronal (Hardingham, 2006; Hetman and Kharebava, 2006; Ikonomidou and Turski, 2002). Así, por ejemplo, el bloqueo de los NMDARs exacerba la muerte neuronal tras un traumatismo cerebral o durante un proceso neurodegenerativo en adultos (Ikonomidou et al., 2000), y también impide la supervivencia de las neuronas recién nacidas en el giro dentado adulto (Tashiro et al., 2006). En general, se admite que la estimulación de los NMDARs sinápticos es la responsable de promover la supervivencia neuronal, predominantemente mediante cambios en la expresión de genes que afectan a múltiples niveles de la función neuronal (**Fig. 2A**). La activación del FT CREB (*cAMP/calcium response element-binding proteína*) (Papadia et al., 2005) tiene un papel central, ya que regula la expresión de genes pro-supervivencia como *bdnf* (*brain derived neurotrophic factor*), *c-fos* o el grupo de genes denominados AID (*activity-regulated inhibitors of death*), que aumentan la resistencia de las mitocondrias al estrés celular (Zhang et al., 2009). Otros mecanismos neuroprotectores mediados por el NMDAR son el aumento de las defensas antioxidantes (Papadia et al., 2008), la inducción de las vías de PI3K-AKT (*Phosphoinositide 3-kinase-v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) (Papadia et al., 2005; Lafon-Cazal et al., 2002) y MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-related kinase*) (Thomas and Huganir, 2004), y la represión transcripcional de los factores pro-muerte FOXOs (*forkhead box O*) y p53 (**Fig. 2A**) (Al-Mubarak et al., 2009; Lau and Bading, 2009). Además de CREB, otros factores de transcripción regulados por Ca^{2+} participan en la supervivencia neuronal ligada a la activación de los NMDARs sinápticos como son los miembros de la familia MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) (Gaudilliere et al., 2002; Mao et al., 1999).

Los NMDARs sinápticos están embebidos en las PSDs, complejos multiproteicos anclados en la membrana postsináptica que desempeñan un papel esencial en la funcionalidad del NMDAR. En ellas, los NMDARs interactúan con otros receptores y canales iónicos, y con proteínas de andamiaje, del citoesqueleto, de adhesión celular y de señalización intracelular (**Fig. 1**) (Kim and Sheng, 2004). Estos complejos ponen en marcha un sistema complejo de señales que incluyen vías

Introducción

dependientes e independientes de calcio, y que determinan el tipo de información que se transmitirá al interior celular.

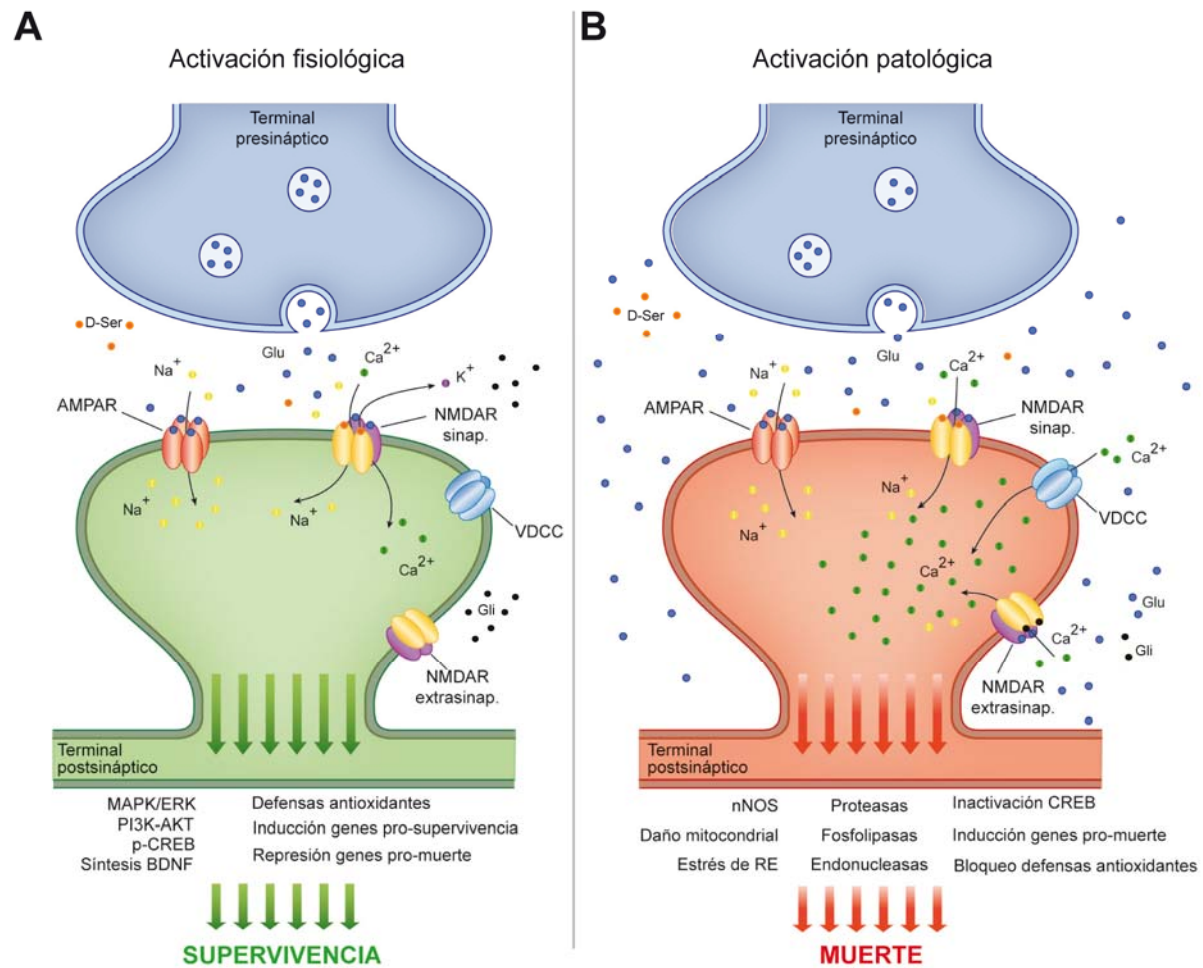


Figura 2. Activación fisiológica y patológica del NMDAR. Implicaciones en vías de supervivencia y muerte neuronal. Representación esquemática de un terminal glutamatérgico mostrando la activación fisiológica (izquierda) y patológica (derecha) del NMDAR por sus coagonistas, glutamato o NMDA y glicina o D-serina. El glutamato es liberado a la brecha sináptica desde el terminal presináptico, mientras que la glicina llega por difusión pasiva desde otros terminales pertenecientes a neuronas glicinérgicas. La activación del NMDAR requiere además la eliminación del bloqueo ejercido por el catión Mg^{2+} . La activación, también por glutamato, de los AMPARs y la consecuente entrada de Na^+ en el terminal postsináptico, induce la despolarización de la membrana y el desbloqueo del NMDAR por Mg^{2+} . En condiciones fisiológicas, la liberación de glutamato se restringe a la brecha sináptica, promoviendo exclusivamente la estimulación de los NMDARs sinápticos. Se produce una entrada moderada de Ca^{2+} y se induce la activación de rutas de señalización implicadas en supervivencia, como la vía de MAPK/ERK o PI3K-AKT, y el aumento de las defensas antioxidantes. La fosforilación del FT CREB induce la expresión del factor neurotrófico BDNF y su receptor TrkB. En condiciones patológicas, la presencia masiva de glutamato en el espacio extracelular induce la activación de los NMDARs sinápticos y extrasinápticos. La entrada inicial de Ca^{2+} a través del NMDAR se ve agravada por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) y la liberación de este catión desde los reservorios del RE y la mitocondria. El aumento de Ca^{2+} intracelular es tóxico para la neurona ya que promueve la activación de proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y enzimas implicadas en la síntesis de óxido nítrico (nNOS), y aumenta el estrés de RE y el daño mitocondrial. Además, se induce el bloqueo de la actividad transcripcional de CREB y la estimulación de vías de muerte celular. *Adaptada de:* (Lopez-Menendez, 2009).

Entre las proteínas de andamiaje es particularmente importante PSD-95 (*postsynaptic density proteína-95*), también conocida como SAP90 (*synapse-associated protein 90*) o DLG4 (*discs-large*

homolog 4). Esta proteína interacciona a través de sus dominios PDZ (*PSD-95/Disc large/Zona occludens-1*) con los 4 aminoácidos C-terminales de las subunidades GluN2 y algunas isoformas de GluN1, denominados ligandos PDZ (PDZ-L, **Fig. 1**) (Kornau et al., 1995). La interacción con PSD-95 facilita la localización correcta de los NMDARs en las regiones sinápticas y su asociación en *clusters* en la superficie neuronal (Ziff, 1997). Además, al enmascarar dominios de internalización, la interacción con PSD-95 da lugar a mayor estabilidad de los NMDARs y el establecimiento de interacciones con estructuras del citoesqueleto (Niethammer et al., 1998). Así por ejemplo, PSD-95 media la interacción del NMDAR con la espectrina cerebral, al igual que PSD-95 una proteína mayoritaria de la PSD que ancla proteínas de membrana con el citoesqueleto de actina (Wechsler and Teichberg, 1998). Finalmente, la interacción con PSD-95 también permite el acoplamiento del NMDAR con moléculas de señalización (**Fig. 1**), como la nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal) (Brenman et al., 1996; Stricker et al., 1997) o moléculas de adhesión celular (Sheng, 2001).

Otras proteínas relacionadas física y funcionalmente con el NMDAR son los receptores de neurotrofinas con actividad tirosina-quinasa (Trk, *receptor tyrosine kinase*) (Miyamoto et al., 2005; Tezuka et al., 1999), que muestran la existencia de una estrecha interconexión entre los sistemas de señalización mediados por el glutamato y el BDNF en los procesos de neuroplasticidad durante el desarrollo y en el adulto. La activación de TrkB a través de su unión a BDNF tiene funciones muy importantes regulando la supervivencia, mantenimiento y crecimiento de las neuronas del SNC y del SN periférico (Bibel and Barde, 2000). Así por ejemplo, BDNF promueve la transfosforilación de las subunidades de tipo GluN2B, contribuyendo de este modo a aumentar la actividad del NMDAR (Levine et al., 1998; Lin et al., 1998). Además, en cultivos de neuronas de hipocampo, esta neurotrofina aumenta la abundancia y el transporte a la membrana de los NMDARs (Caldeira et al., 2007). Por otra parte, a través de la activación de CREB, el glutamato induce la síntesis de BDNF (Hardingham et al., 2002; Papadia et al., 2005) que, a su vez, modifica la sensibilidad neuronal al glutamato, la homeostasis del Ca^{2+} y la plasticidad sináptica (Bano et al., 2005; Lee et al., 2002). Finalmente, nuestro grupo ha demostrado la interacción del NMDAR con Kidins220/ARMS (*kinase D-interacting substrate of 220 kDa/ankyrin repeat-rich membrane spanning*) en neuronas corticales y cerebro (Lopez-Menendez et al., 2009). Esta es una proteína que también forma complejos con los receptores de neurotrofinas y efrinas (Kong et al., 2001), actuando como una molécula obligatoria para el mantenimiento de la activación de ERK necesaria para la diferenciación neuronal en respuesta a neurotrofinas (Arevalo et al., 2006; Arevalo et al., 2004). Adicionalmente, nuestros resultados han demostrado que Kidins220/ARMS contribuye a la viabilidad neuronal en condiciones basales a través de la activación de cascadas de señalización pro-supervivencia mediadas por ERK (Lopez-Menendez et al., 2009).

Introducción

2. La isquemia cerebral y la excitotoxicidad neuronal.

Las ECVs suponen la afectación transitoria o permanente de un área del encéfalo debido a un proceso isquémico o hemorrágico, originado por alteraciones patológicas en los vasos sanguíneos (**Fig. 3**). En ambos casos, la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) y, con ello, de la disponibilidad de glucosa y oxígeno en el cerebro da lugar a la degeneración neuronal. Las alteraciones celulares se producen de forma secuencial y, en primer lugar, se impide la actividad funcional y se produce el llamado “fallo eléctrico” (Hossmann, 1999). Posteriormente, y conforme el FSC va disminuyendo, se suprime la actividad metabólica, lo que incluye sucesos como la inhibición de la síntesis de proteínas y del mRNA, la estimulación de la glicólisis anaeróbica, la reducción de la síntesis de ATP, la despolarización de las membranas celulares y la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular.

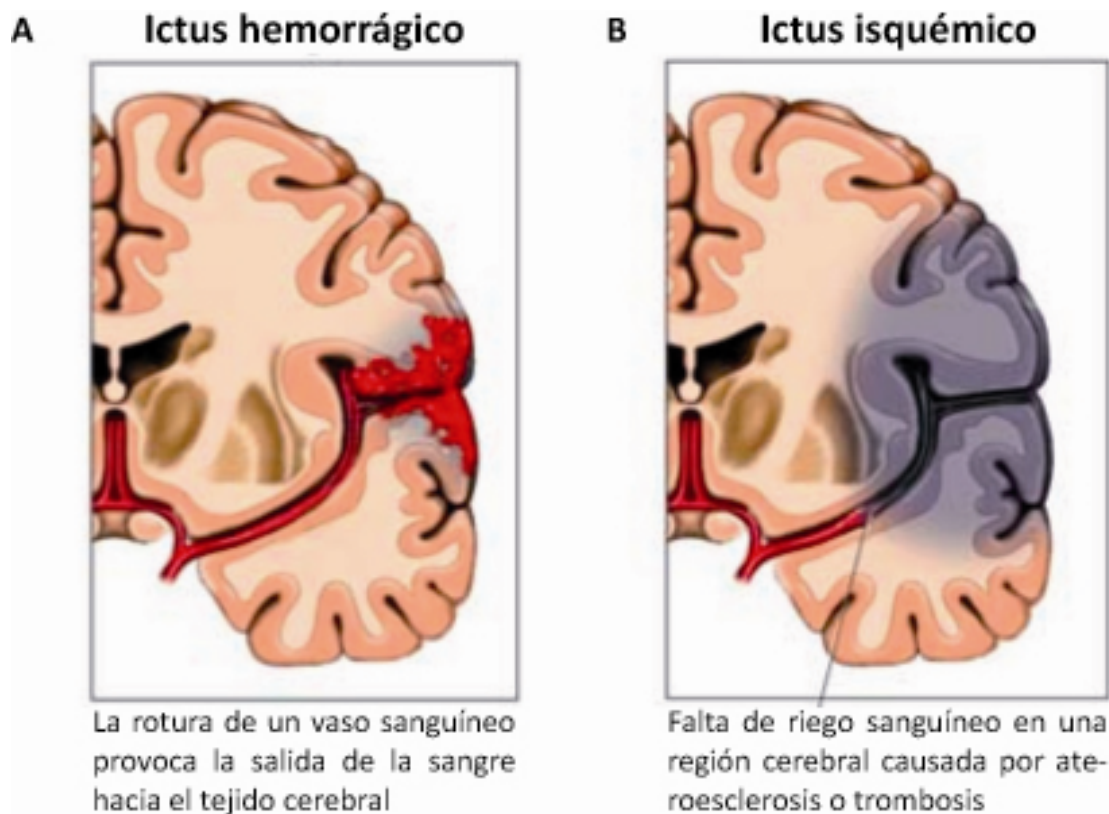


Figura 3. Tipos de ictus según el origen de formación. A) *Ictus hemorrágico*, producido por la rotura de un vaso cerebral y el espasmo vascular asociado a una hemorragia subaracnoidea y la hipertensión intracraneal. B) *Ictus isquémico*, producido por la falta de riego sanguíneo en una región del cerebro debido a la presencia de un trombo o una placa aterosclerótica.

En el tejido isquémico diferenciamos una región central de muerte necrótica o núcleo del infarto, separada del tejido normal por una región coronal o zona de “penumbra”, caracterizada por ser funcionalmente silente pero intacta desde el punto de vista estructural. Sin embargo, si no se

recupera el FSC en un periodo definido de tiempo denominado ventana terapéutica, esta región puede sufrir un proceso de degeneración neuronal retardada o secundaria que da lugar a la expansión gradual del núcleo del infarto hacia la zona de penumbra isquémica. Existe un gran interés por conocer los mecanismos de la muerte neuronal retardada y la forma de bloquearla, para poder así atenuar el daño causado. Hasta la fecha, las terapias utilizadas en el tratamiento del ictus cerebral han sido insatisfactorias y el único tratamiento eficaz clínicamente es la trombolisis con el activador tisular del plasminógeno (tPA), que contribuye a la restauración del FSC después de la isquemia. No obstante, la terapia trombolítica da lugar con relativa frecuencia a hemorragias intracerebrales sintomáticas y, además, el tPA presenta una toxicidad asociada que incrementa la degeneración neuronal en modelos experimentales (Wang et al., 1998). Un problema adicional de este tipo de terapias es la dificultad de conseguir clínicamente la recuperación del FSC dentro de la ventana terapéutica, lo que conlleva a la aparición de alteraciones del tejido cerebral posteriores a la reperusión del mismo.

El mecanismo fundamental en la muerte neuronal secundaria es la excitotoxicidad (Olney, 1986), debida al aumento de la concentración de glutamato en el espacio extracelular causada por la lisis de las neuronas del núcleo del infarto y deficiencias en la recaptación de este aminoácido (Choi and Rothman, 1990). El proceso excitotóxico también juega un papel importante en muchas otras patologías del SNC. Entre ellas destacan alteraciones como el trauma agudo y la epilepsia, y diversas enfermedades neurodegenerativas de carácter crónico, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, corea de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de los priones (Beal, 1992, 1998; Choi, 1988; Gonsette, 2008; Hynd et al., 2004; Koutsilieri and Riederer, 2007; Pitt et al., 2000; Salinska et al., 2005; Tabrizi et al., 1999). Debido a ello, la excitotoxicidad es una diana fundamental en la búsqueda de estrategias de neuroprotección. Dentro de la familia de receptores de glutamato, los NMDARs tienen un papel preponderante en el proceso de excitotoxicidad (Hartley et al., 1993) y, por ello, muchas de estas estrategias se han dirigido al desarrollo de antagonistas de estos receptores. Algunos trabajos han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de varios tipos de demencias mediante el uso de la memantina, un antagonista no competitivo que se une preferentemente al NMDAR en su conformación activa y lo bloquea sin afectar a sus funciones fisiológicas (Chen and Lipton, 2006). Sin embargo, otros muchos antagonistas del NMDAR que dieron buenos resultados en modelos experimentales, no fueron efectivos en ensayos clínicos dirigidos al tratamiento de la isquemia cerebral (Ikonomidou and Turski, 2002) u otras enfermedades neurodegenerativas (Kemp and McKernan, 2002). Para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, es crítico establecer las razones del fracaso de los antagonistas del NMDAR utilizados anteriormente y caracterizar en mayor profundidad cómo actúan los nuevos fármacos desarrollados sobre los NMDARs en un marco fisiopatológico real.

2.1. Alteraciones patológicas en la función del NMDAR.

Aunque el glutamato es un aminoácido excitatorio esencial para la neurotransmisión, como ya mencionamos, a dosis no fisiológicas resulta tremendamente tóxico para las neuronas y promueve su muerte neuronal por excitotoxicidad (Choi, 1988; Hartley et al., 1993). En el proceso isquémico, la presencia de glutamato no se limita a la brecha sináptica y se produce una entrada masiva de Ca^{2+} a través de los NMDARs sinápticos y extrasinápticos (**Fig. 2B**). Esta circunstancia se ve agravada por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) y por la liberación de este catión desde los reservorios del retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, consecuencia de la acción de segundos mensajeros generados tras la activación de los mGluRs. Este aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular resulta tóxico para la neurona por mecanismos que no están totalmente definidos, aunque existen evidencias de que esta toxicidad está relacionada con la duración y la amplitud de la señal generada (Orrenius et al., 1996). Junto con el daño mitocondrial y el estrés de RE, el Ca^{2+} promueve la activación de enzimas implicadas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, y en la síntesis de óxido nítrico (NO) (Sattler and Tymianski, 2000). Así, por ejemplo, la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII), algunos miembros de la familia de las proteínas quinasas C (PKCs), otras quinasas como p38 y las JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*), la nNOS, la proteasa calpaína, y las fosfolipasas A_2 (PLA_2) y C_γ (PLC_γ) son algunas de las actividades enzimáticas inducidas por este catión en excitotoxicidad (**Fig. 2B**).

Una proteína de suma importancia en la excitotoxicidad neuronal y en patologías relacionadas con este proceso es la calpaína (Hong et al., 1994b; Siman and Noszek, 1988). Esta cisteín-proteasa dependiente de Ca^{2+} juega un papel dual en los mecanismos de supervivencia y muerte celulares. En el sistema nervioso existen dos calpaínas, μ y m , también conocidas como calpaína I o II respectivamente. La primera se encuentra en el citosol o próxima a la membrana, siendo activada *in vitro* por concentraciones de calcio en el orden μM . Por el contrario, la m -calpaína se localiza en la membrana y requiere concentraciones en el rango mM . Esta sensibilidad diferencial por el calcio tiene importancia funcional, ya que las concentraciones fisiológicas de este ión fluctúan en el rango 100-1.000 nM y pueden alcanzar 5-10 μM en condiciones de excitotoxicidad (Hyrz et al., 1997). Por tanto, cambios pequeños en la concentración de calcio podrían afectar la actividad de la μ -calpaína, mientras que m -calpaína probablemente se active a través de la proteína quinasa A (PKA) (Wu et al., 2007) u otras quinasas por definir. Estas proteasas tienen además un papel fundamental en la muerte neuronal donde, junto a otras proteasas de la familia de las caspasas, inducen cambios irreversibles en la célula. Ambas familias de proteasas comparten muchos de sus sustratos, si bien éstos son procesados de forma diferente por cada una de ellas (Wang, 2000). Aunque generalmente se acepta que la muerte neuronal por excitotoxicidad es debida mayoritariamente a procesos de tipo

necrótico, diversas evidencias muestran que también ocurre por apoptosis, particularmente en la región de penumbra isquémica (Bonfoco et al., 1995). En realidad, ambos mecanismos están íntimamente ligados y prueba de ello es la estrecha relación existente entre la activación de calpaína, tradicionalmente asociada con la muerte por necrosis, y la de caspasas, relacionada con la muerte apoptótica (Neumar et al., 2003). De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado la activación de calpaína (Hong et al., 1994a) y caspasa-3 (Fink et al., 1998) en modelos de isquemia, y un efecto neuroprotector ejercido por los inhibidores de estas proteasas (Endres et al., 1998; Hong et al., 1994a; Hong et al., 1994b).

A diferencia de otros sistemas proteolíticos, la calpaína es una “proteasa moduladora” capaz de procesar múltiples sustratos modificando su función o localización subcelular (Vosler et al., 2008). Algunos de los sustratos de esta proteasa tienen papeles cruciales en las vías de supervivencia neuronal. Entre ellos, se encuentra el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX; *Na⁺/Ca²⁺ exchanger*) (Bano et al., 2005), el sistema más importante de eliminación de Ca^{2+} citosólico de la célula, cuya inactivación por calpaína impide recuperar los niveles basales de Ca^{2+} tras la sobre-estimulación de los NMDARs. Esta proteasa también procesa a p35, regulador neuronal de Cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*), dando lugar a la deslocalización y activación prolongada de esta quinasa, la hiperfosforilación de la proteína tau y otras proteínas sustrato, y la muerte neuronal (Lee et al., 2000). Otros sustratos de esta enzima en condiciones de excitotoxicidad son la CaMKII (Hajimohammadreza et al., 1997), algunos miembros de la familia de las PKCs y espectrina. En algunos casos se ha caracterizado que la afinidad de la calpaína por sus sustratos puede verse alterada por modificaciones postraduccionales de estos, como por ejemplo su fosforilación o glicosilación (Melloni and Pontremoli, 1989).

El trabajo de los últimos años de nuestro grupo ha puesto de manifiesto una importante cooperación entre el procesamiento mediado por calpaína y mecanismos de tipo transcripcional para la inhibición de determinadas vías críticas para la supervivencia neuronal (**Fig. 4**). Así por ejemplo, en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* e isquemia cerebral transitoria, la calpaína es responsable del procesamiento coordinado del extremo C-terminal de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAR, junto con su proteína interaccionante PSD-95, dando lugar a NMDARs truncados incapaces de asociarse con las proteínas señalizadoras y del citoesqueleto de la PSD (Gascon et al., 2008b). Adicionalmente, se produce la inhibición de la transcripción del gen *glun1*, que da lugar a la disminución de los niveles de esta subunidad obligatoria del NMDAR (Gascon et al., 2005). En conjunto, ambos tipos de procesos constituyen un mecanismo de autorregulación negativa del NMDAR que impide su función normal tanto en la transmisión sináptica como en la supervivencia neuronal.

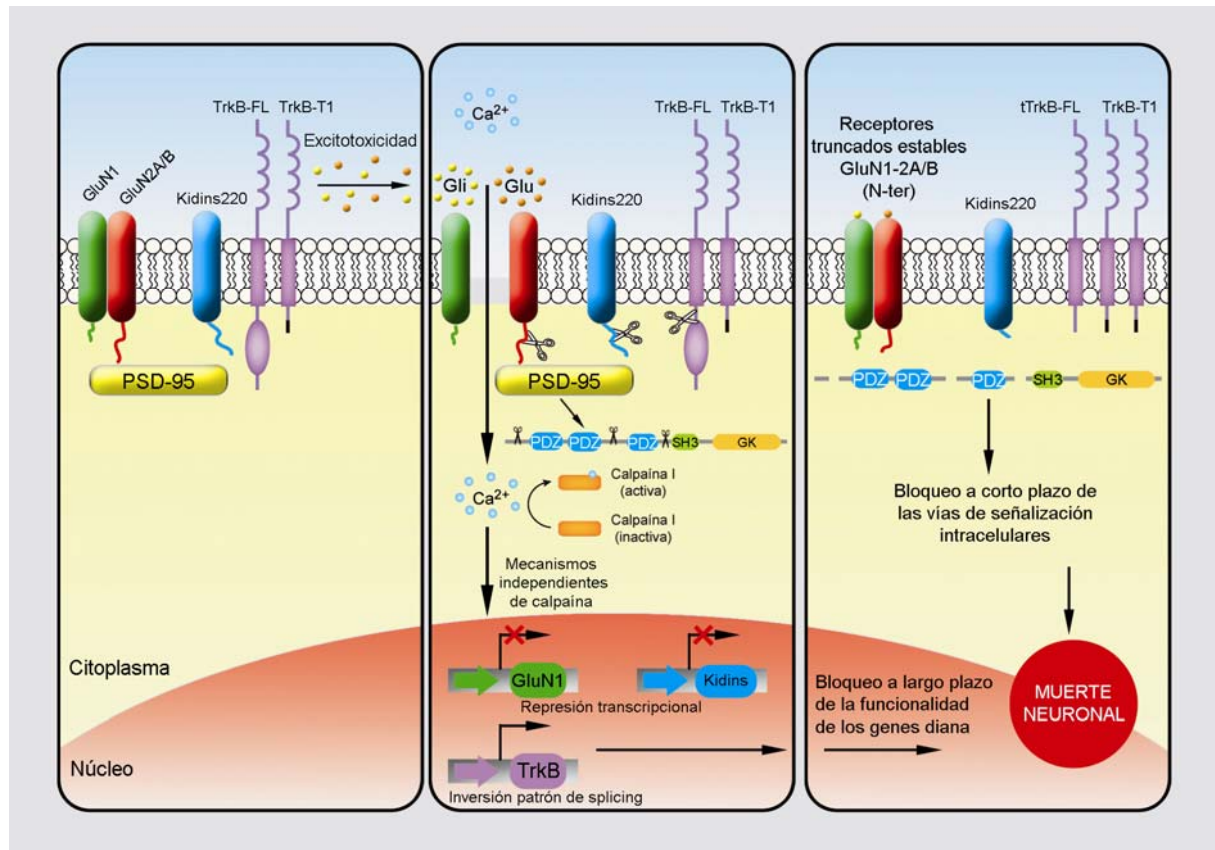


Figura 4. Regulación del NMDAR y otras proteínas relacionadas relevantes en la supervivencia neuronal en los procesos de excitotoxicidad e ischemia cerebral. En situación fisiológica, la proteína de andamiaje PSD-95 se asocia con las subunidades GluN2A y GluN2B (GluN2A/B) del NMDAR en la superficie neuronal a través de sus dominios PDZ. El receptor de neurotrofinas TrkB en neuronas se expresa fundamentalmente como las isoformas TrkB-FL, con actividad tirosina quinasa, y truncada TrkB-T1, que funciona como un dominante negativo del receptor TrkB funcional. A su vez, Kidins220/ARMS se asocia con las subunidades GluN1 y GluN2 en la superficie neuronal, así como con TrkB. En condiciones excitotóxicas, la sobreactivación de NMDARs que contienen subunidades de tipo GluN2B induce una entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas. Esto produce la activación, entre otras, de calpaína I, proteasa que procesa las regiones C-terminales de las subunidades GluN2A y GluN2B, dando lugar a subunidades truncadas N-terminales que permanecen en la membrana celular interaccionando con GluN1. La calpaína también procesa a PSD-95 en sus regiones interdominio, a TrkB-FL en la región yuxtamembrana y a Kidins220/ARMS en regiones C-terminales. El procesamiento de PSD-95 y GluN2A/B produce el desacoplamiento del NMDAR de las proteínas de señalización y del citoesqueleto celular. La proteólisis de TrkB-FL da lugar a un receptor truncado con un tamaño similar a TrkB-T1, que podría actuar también como dominante negativo. Un segundo mecanismo de tipo transcripcional regula negativamente la expresión de GluN1 y Kidins220/ARMS, e invierte el patrón de *splicing* alternativo del mRNA de TrkB en excitotoxicidad, dando lugar a un aumento de la isoforma TrkB-T1 y la disminución de TrkB-FL, GluN1 y Kidins220/ARMS. En conjunto, resulta evidente la redundancia en los mecanismos de regulación negativa de las vías de supervivencia neuronal inducidos por sobreactivación del NMDAR, sugestivo de la gran relevancia funcional del silenciamiento de ciertas cascadas de señalización durante el proceso de excitotoxicidad. Tomada de: (Vidaurre, 2011).

Otro ejemplo es la inhibición en excitotoxicidad e ischemia de la vía BDNF/TrkB. La regulación del receptor de neurotrofinas TrkB consiste en la modificación en sentido opuesto de los niveles de sus isoformas catalíticamente activa (TrkB-FL) y truncada (TrkB-T1) mediante dos mecanismos (**Fig. 4**): la inversión del patrón normal de procesamiento alternativo de su pre-mRNA, y la proteólisis por calpaína de TrkB-FL en posiciones que generan una proteína truncada de tamaño similar a TrkB-T1 y

que, al igual que ella, podría actuar como un dominante negativo (Vidaurre et al., 2012). Adicionalmente, una combinación de mecanismos transcripcionales y la activación de calpaína también regulan de forma negativa a Kidins220/ARMS, y ello contribuye a la muerte neuronal (Lopez-Menendez et al., 2009).

2.2. Mecanismos de control de la expresión génica en excitotoxicidad e isquemia.

Las alteraciones de la expresión génica inducidas por la activación patológica de los NMDARs tienen gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. En neuronas de hipocampo existen dos programas transcripcionales, que prácticamente no solapan y conducen a la supervivencia o muerte neuronales (Zhang et al., 2007). El tipo de respuesta transcripcional viene determinado por la localización en la membrana neuronal de los NMDARs activados: mientras que el flujo de calcio a través de los NMDARs sinápticos activa genes de supervivencia e inhibe la expresión de los de muerte (**Fig. 2A**), la activación de los NMDARs extrasinápticos no es capaz de poner en marcha los programas de neuroprotección e induce la expresión de genes que favorecen la muerte (**Fig. 2B**). Uno de los genes activados por la sobreactivación *in vitro* de los NMDARs extrasinápticos (Zhang et al., 2007) o en un modelo de isquemia (Wahl et al., 2009) es *Clca1*, que codifica el regulador del canal de cloro Ca^{2+} -dependiente 1. La sobre-expresión de este canal es suficiente por sí misma para provocar la muerte neuronal (Wahl et al., 2009; Zhang et al., 2007). Existe mucho interés por establecer los FTs y los mecanismos epigenéticos que modulan estos programas de transcripción diferencial, tema al que pretende contribuir esta tesis doctoral. En algunos casos se ha podido establecer la regulación en condiciones patológicas de determinados FTs que, previsiblemente, afectarán a la expresión de toda la batería de genes por ellos regulada. Este es el caso del coactivador transcripcional PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator 1 α*), que controla importantes procesos fisiológicos como el metabolismo de la glucosa, la homeostasis energética, la biogénesis mitocondrial y las defensas antioxidantes (Handschin, 2009; St-Pierre et al., 2006; Wareski et al., 2009). La expresión de este coactivador transcripcional, gen diana para CREB, es suprimida por la proteína mHtt (*mutant Huntingtin*) en la enfermedad de Huntington (Cui et al., 2006; Weydt et al., 2006), y también se reprime en las de Alzheimer (Qin et al., 2009) y Parkinson (Shin et al., 2011), todas ellas patologías asociadas con el proceso de excitotoxicidad. Además, la expresión exógena de PGC-1 α ejerce un efecto protector en modelos experimentales de las patologías anteriores, así como tras el daño isquémico o excitotóxico (Cui et al., 2006; Chen et al., 2010; Luo et al., 2009; Mudo et al., 2012; Qin et al., 2009; Shin et al., 2011).

Hasta el momento se desconoce de qué modo distingue el núcleo neuronal entre las señales inducidas por la activación de los NMDARs sinápticos o extrasinápticos. Una posibilidad es que se

deba a la asociación diferencial de determinadas proteínas a uno u otro tipo de receptores. Muchos de los complejos asociados al NMDAR ya han sido identificados (Husi et al., 2000; Sheng and Kim, 2002), pero todavía no está bien establecido que proteínas se unen específicamente a cada subtipo de receptor. Recientemente se ha descrito que la proteína Jacob está unida en la PSD a caldendrina, de manera Ca^{2+} -dependiente, y que esta interacción impide la unión de su secuencia de localización nuclear (NLS) a importina α y mantiene a Jacob en las espinas sinápticas (Dieterich et al., 2008). La conservación de la interacción Jacob-caldendrina requiere niveles sinaptodendríticos sostenidos de Ca^{2+} , que al parecer no se alcanzan al activar los NMDARs extrasinápticos. Además, la estimulación de estos receptores da lugar a la activación de la calpaína y al procesamiento del extremo miristoilado N-terminal de Jacob, que es traslocada al núcleo (Dieterich et al., 2008; Kindler et al., 2009) donde induce la defosforilación sostenida e inactivación de CREB (Dieterich et al., 2008).

Recientemente se ha empezado a establecer la importancia que tienen las redes de regulación de la expresión génica basadas en el RNA no codificante (ncRNAs) en la patología de diversas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas, incluida la isquemia cerebral (Qureshi & Mehler, 2010). En general, estas moléculas pueden interaccionar con DNA, RNA o proteínas participando en diversas actividades de tipo estructural, funcional o regulatorio, como por ejemplo, la organización nuclear, el control transcripcional y postranscripcional, o mecanismos de tipo epigenético. Además de los RNAs de transferencia (tRNAs) y ribosómicos (rRNAs), los ncRNAs incluyen subclases de descubrimiento más reciente como los microRNAs (miRNAs), RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs), RNAs largos no codificantes (lncRNAs) o RNAs interferentes pequeños (siRNAs). Los ncRNAs confieren a las células neurales la capacidad de ejercer un control espacio-temporal muy preciso sobre la inhibición de la expresión génica, necesario para la ejecución de programas neurobiológicos complejos. Así, por ejemplo, los miRNAs miR-124 y miR-9/9* participan en la modulación de la expresión génica neuronal ya que están integrados en los circuitos de CREB, REST/NRSF (*RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor*; a partir de aquí nos referiremos a esta proteína simplemente como REST) y CoREST (*corepressor response element-1 silencing transcription factor*), importantes reguladores transcripcionales y epigenéticos en neuronas (Packer et al., 2008; Wu and Xie, 2006). Los miRNAs tienen una longitud promedio de 22 nucleótidos y, en células animales, se unen principalmente a secuencias complementarias imperfectas de la región 3' no-traducida (3'-UTR) de sus mRNAs diana, produciendo su degradación o represión traduccional. Gracias a que cada miRNA es capaz de regular cientos de mRNAs diana, los miRNAs neuronales constituyen un mecanismo muy poderoso de regulación de la diferenciación neuronal, sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Schratt, 2009). En modelos animales de isquemia cerebral se ha observado una regulación muy selectiva y temporal de determinados miRNAs en cerebro posisquémico (Dharap et al., 2009; Jeyaseelan et al., 2008). Esta expresión diferencial de miRNAs se

correlaciona con la de sus mRNAs diana, conocidos moduladores de la transcripción, homeostasis iónica, inflamación y otras respuestas a estrés. Por ejemplo, la expresión de miRNA-145 aumenta muy rápidamente en cerebro después de la oclusión de la arteria cerebral media (3 h) y se mantiene hasta las 72 h. Uno de sus mRNAs diana codifica para SOD-2 (*superoxide dismutase-2*), que es fundamental para el SNC porque está implicada en las defensas antioxidantes por lo que su disminución afectaría a la supervivencia neuronal tras la isquemia. Es interesante que algunos miRNAs que se expresan abundantemente en el tejido cerebral pueden detectarse en sangre periférica (Jeyaseelan et al., 2008), sugiriendo que no solo participan como mediadores de las respuestas sistémicas a la isquemia cerebral sino que también podrían ser considerados como biomarcadores clínicos.

Otra subclase de ncRNAs que juegan un papel muy importante en isquemia son los lncRNAs, RNAs de al menos 200 nucleótidos que son transcritos a partir de regiones intergénicas, secuencias reguladoras (promotores, *enhancers*, UTRs) o regiones cromosómicas específicas como los telómeros. Están implicados en la regulación de la expresión génica mediante la remodelación de cromatina, control transcripcional y postranscripcional, incluyendo el procesamiento alternativo, transporte, edición, transporte, degradación y traducción de mRNAs (Mercer et al., 2009). En condiciones fisiológicas participan en el desarrollo de axones y conexiones dendríticas, y en la modulación sináptica asociada a la plasticidad neuronal y la generación de la LTP (Mercer et al., 2008). En isquemia cerebral, los lncRNAs pueden unirse a genes como el de *ciclina D1*, mediador crítico en la muerte neuronal en este tipo de procesos (Rashidian et al., 2005). Esta unión favorece el reclutamiento de la proteína de unión a RNA TLS (*translocated in sarcoma*) que reprime la transcripción de dicho gen (Wang et al., 2008), sugiriendo que estos lncRNAs tienen un papel neuroprotector.

2.3. Mecanismos responsables del papel dual de los NMDARs en la supervivencia y muerte neuronales.

Algunos grupos se han centrado en tratar de establecer los mecanismos bioquímicos responsables de la dualidad de los NMDARs como moléculas clave para la supervivencia neuronal y, al mismo tiempo, proteínas críticas en vías de señalización que conducen a la muerte celular. Durante bastantes años se pensó que los niveles de entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs eran el único factor determinante del tipo de respuesta celular. Sin embargo, los datos más recientes sugieren que la localización específica de los NMDARs en la membrana plasmática es la que establece su acoplamiento con un tipo de vía de señalización u otra al afectar a sus propiedades biofísicas (Li et al., 2002) y, por tanto, a la respuesta celular generada tras su activación (Zhang et al., 2007). En el año

2002, se demostró que la activación de los NMDARs localizados en las sinapsis promueve la supervivencia neuronal, acoplada a la activación de CREB y a la expresión de BDNF (**Fig. 2A**). Por el contrario, la estimulación del conjunto de los NMDARs, tanto sinápticos como extrasinápticos, tal como ocurre en excitotoxicidad, conduce a la inhibición de forma dominante de CREB y al bloqueo de la producción de BDNF y está ligada, por tanto, a vías de muerte neuronal (**Fig. 2B**) (Hardingham et al., 2002). Una situación similar se ha demostrado en el caso de la activación de ERK-1/2 por estimulación de NMDARs sinápticos (Thomas and Huganir, 2004), aunque aún existe cierta controversia acerca del efecto producido por la sobreactivación conjunta de los receptores ubicados en localizaciones sinápticas y extrasinápticas (Chandler et al., 2001; Ivanov et al., 2006; Leveille et al., 2008). Por otra parte, la potenciación de las defensas antioxidantes dependiente de la activación fisiológica del NMDAR parece estar comprometida cuando existe estimulación de los receptores ubicados en posiciones extrasinápticas (Papadia et al., 2008). De forma general se acepta que el aumento en la concentración de glutamato que tiene lugar en condiciones excitotóxicas, al no estar restringida a la brecha sináptica, promueve la activación de los NMDARs localizados en las regiones extrasinápticas, bloqueando de este modo los efectos neuroprotectores y pro-supervivencia propios de la estimulación sináptica.

Sin embargo, algunos datos sugieren que es la composición del receptor, y no su localización, la que resulta crucial a la hora de determinar el tipo de respuesta en las neuronas maduras. La activación de los NMDARs que contienen subunidades GluN2B, predominantes en zonas extrasinápticas como mencionamos en el apartado **1.3** (Li et al., 1998; Rumbaugh and Vicini, 1999), sería responsable de la muerte neuronal excitotóxica. Por el contrario, la estimulación de receptores formados por subunidades de tipo GluN2A, mayoritarios en regiones sinápticas (Monyer et al., 1994), tendría carácter neuroprotector y promovería la supervivencia (Kim et al., 2005; Liu et al., 2004b). Sin embargo, esta explicación se complica porque, como vimos, las subunidades GluN2A y GluN2B pueden encontrarse tanto en compartimentos sinápticos como extrasinápticos (Thomas and Huganir, 2004). Muy recientemente se han obtenido nuevos datos que podrían permitir conciliar las dos hipótesis anteriores (Papouin et al., 2012). Se ha demostrado que los aminoácidos D-serina y glicina, coagonistas endógenos del NMDAR junto al glutamato, actúan respectivamente sobre los NMDARs sinápticos y extrasinápticos, y que esta activación diferencial contribuye además a la segregación espacial de los NMDARs formados por subunidades GluN2A y GluN2B entre posiciones sinápticas y extrasinápticas. Esta compartimentalización funcional deriva de la disponibilidad de glicina y D-serina en cada subregión neuronal y esta emparejada con la afinidad preferencial de los NMDARs para cada uno de estos coagonistas (Papouin et al. 2012). Un resultado conflictivo de este trabajo es la observación de que en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo es la activación de los NMDARs sinápticos la responsable de la neurotoxicidad.

3. Regulación de la expresión de las subunidades GluN1 en condiciones fisiológicas y de excitotoxicidad.

3.1. Identificación del promotor del gen *glun1*.

La identificación de secuencias promotoras en el genoma sigue siendo una tarea difícil hoy en día ya que, al no existir ningún consenso universal, depende en gran medida del mapeo experimental de las secuencias iniciadoras de la transcripción (TSSs, *transcription start sites*) o de los extremos 5' del mRNA (Wray et al., 2003). El primer gen codificante para el NMDAR para el que pudo mapearse su extremo 5' fue *glun1* (Bai and Kusiak, 1993). El análisis de una región de 3'8 Kb del gen *glun1* de rata que contenía 3 Kb de región promotora, el exón 1 y una parte del intrón 1 permitió identificar dentro de una región rica en GC dos TSSs diferentes, en posiciones -276 y -238 respecto al primer nucleótido en el codón iniciador (**Fig. 5**). Sin embargo, no se pudo identificar la existencia de una caja TATA o CAAT. Estos datos se corroboraron en el gen humano (Zimmer et al., 1995) y llevaron a la conclusión de que *glun1* era un gen de expresión constitutiva. Análisis posteriores mostraron que el uso de los TSSs de *glun1* es dependiente del tipo celular, al igual que se ha establecido para otros muchos genes. El TSS proximal es el prioritariamente reconocido en cerebro mientras que el distal es utilizado por las células PC12, línea celular establecida a partir de un feocromocitoma de rata que expresa el mRNA de *glun1* pero en la que, sin embargo, no se detecta la proteína (Bai and Kusiak, 1997). Una posibilidad es que la región 5' UTR adicional del mRNA al usar el TSS distal interfiera con el inicio de la traducción (Awobuluyi et al., 2003b). Sin embargo, no está todavía claro si la transcripción desde el TSS distal es parte de un mecanismo de control de la expresión o simplemente una aberración propia de la línea celular PC12.

Las secuencias promotoras mínimas necesarias para el control de la iniciación de la transcripción han sido caracterizadas funcionalmente para los diferentes genes codificantes del NMDAR. En el caso del gen *glun1* de rata, utilizando ensayos de actividad reportera con luciferasa y líneas celulares como PC12 o cultivos primarios neuronales, se ha establecido que el promotor basal está contenido en la secuencia -1 a -356 pb (Bai and Kusiak, 1995; Krainc et al., 1998). Posteriormente se descubrió que una secuencia de 5'4 Kb (-1 a -5,400) incrementaba significativamente la actividad luciferasa, sugiriendo que esta región poseía múltiples elementos potenciadores o *enhancer* (**Fig. 5**) (Bai et al., 2003).

3.2. Regulación de la transcripción de *glun1* durante el desarrollo y la diferenciación neuronal por elementos en *cis* y factores en *trans*.

La inducción transcripcional de *glun1* se inicia alrededor de los 14 días de desarrollo embrionario, cuando comienza a detectarse su mRNA en el cerebro de rata (Laurie and Seeburg, 1994). Esto ocurre, en gran medida, mediante la eliminación de la represión de su promotor, bloqueado inicialmente por la interacción de un elemento RE1/NRSE (*repressor element 1/neuron-restrictive silencing element*; a partir de aquí simplemente RE1) presente en la secuencia -150/-130 (**Fig. 5**) con el represor REST, cuyos niveles disminuyen a lo largo de la diferenciación (Bai et al., 2003). Este represor, cuyos niveles son elevados en células no neuronales y progenitores neuronales, es clave en la regulación de otros muchos genes neuronales (Lunyak and Rosenfeld, 2005), como veremos más adelante. Sin embargo, también se ha descrito la importancia para la regulación de *glun1* de activadores como los FTs de la familia Sp1 (*specific protein 1*) (Bai and Kusiak, 1995), que se expresan durante la diferenciación neuronal y se unen a cajas GC (5'-GGGGCGGGG) o GT/CACC (5'-GGTGTGGGG) presentes en este promotor. Dos secuencias Sp1 en tandem próximas al TSS han sido analizadas funcionalmente y demostrado que participan en la regulación positiva del promotor de *glun1* en respuesta a factores de crecimiento (Bai and Kusiak, 1995, 1997). Es interesante que a estas mismas cajas GC proximales a las que se unen Sp1 y Sp3 pueden también interaccionar con los FTs Egr1 (*Early Growth response-1*) y MAZ (*Myc-associated zinc finger protein*) (Bai and Kusiak, 1995; Okamoto et al., 2002b). Puesto que las cajas GC son elementos en *cis* muy frecuentes en las regiones reguladoras de los genes importantes para la función del SN, probablemente se necesita un balance adecuado entre diversos factores en *trans* para el mantenimiento de la función neuronal.

Otro aspecto interesante del promotor *glun1* es la existencia de un sitio perfecto para el FT NFκB (*nuclear factor kappa- B*) situado unas 3 Kb más arriba de los TSSs que, sin embargo, no se une a NFκB sino que forma complejos exclusivamente con FTs de la familia Sp, como Sp1 y Sp3 (**Fig. 5**) (Liu et al., 2004a). La existencia de estos complejos en neuronas se ha demostrado mediante experimentos de ChIP, observándose que la fuerza de la unión de las diferentes proteínas Sp varía a lo largo de la diferenciación neuronal (Liu et al., 2004a). Cerca del elemento NFκB, en el promotor distal, se encuentra una secuencia consenso tipo AP1 que también participa en la regulación de *glun1* (Bai and Kusiak, 1993). El promotor presenta además en posición -811/-788 una secuencia de reconocimiento para MEF2C (**Fig. 5**), proteína perteneciente a la familia de FTs denominados MADS (*MCM1-agamous-deficiens-serum response factor*), que mediante su unión regula positivamente este promotor en neuronas. Sorprendentemente, para esta regulación, MEF2C coopera con factores Sp1 que interaccionan con el tandem de cajas GC proximales (-292/-269) del promotor (Krainc et al., 1998).

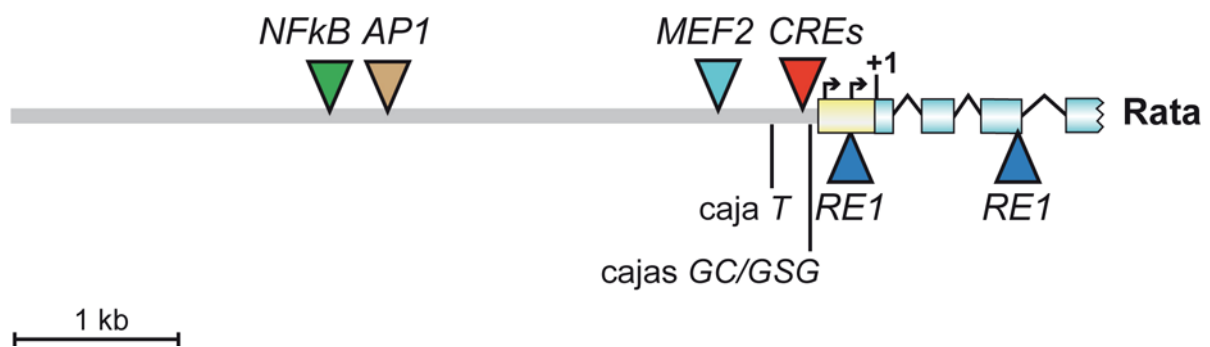


Figura 5. Estructura del extremo 5' del gen *glun1* de rata. Representación esquemática donde se muestran las secuencias genómicas, que abarcan los TSSs (flechas), secuencias flanqueantes 5', y los exones e intrones iniciales del gen *glun1* de rata. Se indican mediante triángulos de diferentes colores las posiciones aproximadas de las secuencias de unión identificadas para FTs. Las líneas continuas indican las secuencias no transcritas (gris) e intrónicas (líneas quebradas). La caja amarilla corresponde a secuencias exónicas no traducidas del mRNA (UTR) y las azules representan los exones codificantes. Se muestra el inicio de la traducción (+1). *Adaptada de:* (Bai and Hoffman, 2009).

En la regulación de GluN1 durante la diferenciación neuronal tienen un papel importante los miembros de la familia Egr. Estos FTs reconocen elementos EgrRE (*Egr response element*) o cajas GSG (5'-GCG5CG-3') cercanas a los TSSs de sus genes diana, entre los que se encuentra *glun1* (Bai and Kusiak, 1993) y, por lo general, funcionan como activadores transcripcionales. Las proteínas Egr se inducen de forma transitoria en neuronas en respuesta a señales ambientales tales como el tratamiento con neurotrofinas o glutamato y, en el caso del promotor del gen *glun1*, median los efectos del NGF (*Nerve Growth Factor*) a través de su unión a la caja GSG (**Fig. 5**) (Bai and Kusiak, 1997). Otros elementos críticos en la regulación de *glun1* son tres secuencias CRE (*cAMP response element*) que son reconocidas por el FT CREB tras su fosforilación y activación en respuesta a determinadas señales (Lau et al., 2004). Muy recientemente, en la etapa final de esta tesis, se ha publicado la demostración de que estas secuencias CRE también participan en la síntesis *de novo* de GluN1 inducida por la neurotrofina BDNF (Kim et al., 2012). Anteriormente se conocía que en neuronas hipocámpicas, BDNF inducía la expresión de GluN1 mediante un mecanismo transcripcional (Caldeira et al., 2007). Los nuevos datos revelan que el efecto de BDNF sobre la expresión de GluN1 está mediado por la activación de su receptor TrkB y, tras su fosforilación, la activación de la vía de las MAPKs, y la unión de CREB y Egr3 a sus elementos de respuesta en el promotor proximal de *glun1* (Kim et al., 2012).

3.3. Producción de diferentes isoformas de GluN1 mediante el procesamiento alternativo de su mRNA.

Como se mencionó anteriormente, existen 8 variantes de procesamiento para el mRNA de GluN1 (GluN1-1a/4a y GluN1-1b/4b) que contribuyen a la diversidad funcional de los NMDARs. Las

isoformas de GluN1 difieren entre sí por la presencia o ausencia en la región N-terminal de una secuencia de 21 aminoácidos correspondiente al exon 5 (región N1: presente en las isoformas tipo “b” y ausente en las “a”) y el procesamiento diferencial de los exones 21 y 22, que da lugar a cambios en las secuencias de la región C-terminal (unidades C1, C2 y C2') (Hollmann and Heinemann, 1994; Zukin and Bennett, 1995). La región N1 es importante en la regulación de las propiedades del canal, ya que modifica su sensibilidad a espermina, al pH y al zinc (Dingledine et al., 1999). Por otra parte, los exones de la región C-terminal tienen un papel importante en la regulación y localización del NMDAR en la membrana celular. Así, el exón 21 codifica para C1 y contiene residuos de serina susceptibles de ser fosforilados por PKC y PKA, modificación involucrada en la activación de GluN1 en respuesta a glutamato (Tingley et al., 1993). Mientras que la regulación por PKC de la acumulación del NMDAR en la sinapsis es independiente de la isoforma de GluN1 presente en el mismo (Ferreira et al., 2011), el dominio C1 está implicado en la interacción con PP1 (*Protein Phosphatase 1*) y PKA mediada por la proteína de andamiaje Yotiao (**Fig. 1**) (Westphal et al., 1999). Estas secuencias C1 son también diana para la interacción con calmodulina quinasa, proteína que puede modular negativamente la actividad del NMDAR (Ehlers et al., 1996), y con neurofilamentos, que participan en el posicionamiento de los NMDARs en la membrana (Ehlers et al., 1998). Adicionalmente, dentro del dominio C1 de GluN1 existen secuencias de retención en el RE, que participan en el transporte de los NMDARs a la membrana (Scott et al., 2001), y una secuencia NLS bipartita (**Fig. 1**) (Holmes et al., 2002). En base a los datos existentes para otras proteínas integrales de membrana como Notch (Struhl and Adachi, 1998) o APP (Nakayama et al., 2011), se ha sugerido que la secuencia NLS presente en las isoformas GluN1-1 y GluN1-3 sería responsable del transporte al núcleo de un hipotético fragmento citosólico producido por proteólisis de GluN1, que podría tener funciones reguladoras de la expresión génica (Holmes et al., 2002). Hasta el momento se desconocen la proteasa responsable del procesamiento de GluN1 y la función del posible fragmento C-terminal, aunque se ha sugerido que podría tratarse de un mecanismo para el transporte nuclear de la calmodulina. Esta proteína interacciona con GluN1 en secuencias próximas a la NLS (Ehlers et al., 1996) y, una vez en el núcleo, interaccionaría con la CaMKIV para modular la fosforilación de CREB (Deisseroth et al., 1998). En cualquier caso, en la comunicación entre sinapsis y núcleo durante los procesos de LTP (Thompson et al., 2004), tiene un papel crítico la regulación del importe nuclear activo, que está mediado por la interacción del dominio C1 de GluN1 con la importina α de manera dependiente de la actividad sináptica (Jeffrey et al., 2009). La fosforilación de GluN1 por PKC en secuencias próximas a la NLS induce la liberación de la importina α , que podría unirse a cargos solubles y transportarlos al núcleo. Es decir que éste podría ser un mecanismo de regulación transcripcional que contribuiría a la plasticidad sináptica (Jeffrey et al., 2009). Estos resultados concuerdan con resultados anteriores mostrando que las isoformas de GluN1 que contienen el

segmento C1 son necesarias específicamente para promover respuestas transcripcionales eficientes tras la activación de los NMDARs (Bradley et al., 2006).

Respecto al exón 22, su procesamiento puede dar lugar a dos unidades diferentes, C2 o C2'. Los aminoácidos del extremo C-terminal en las isoformas de GluN1 que contienen la unidad C2' constituyen un dominio de unión a proteínas PDZ (**Fig. 1**), proteínas multi-dominio que como mencionamos median complejas interacciones proteicas y la asociación del NMDAR en *clusters* sobre la superficie celular (Okabe et al., 1999). Mediante estas interacciones el dominio C2' puede enmascarar las señales de retención en el RE presentes en la región C1, facilitando el transporte y ensamblaje de los NMDARs a la membrana (Scott et al., 2001). El procesamiento alternativo en las secuencias C2/C2' ocurre de forma dependiente de la actividad sináptica, estando favorecida la expresión de la variante C2' en condiciones de baja actividad. Las isoformas GluN1-3 y GluN1-4 expresadas en estas condiciones tienen, además, muy facilitado el tráfico desde el RE al Golgi gracias a que también unen COPII (Mu et al., 2003). El transporte a la membrana de la isoforma GluN1-4 está particularmente favorecido, ya que contiene la unidad C2' pero carece de C1 y, por tanto, de las secuencias de retención en el RE presentes en dicho dominio (Standley et al., 2000).

3.4. Contribución de mecanismos postranscripcionales a la expresión de GluN1.

Los mecanismos postranscripcionales también contribuyen a la regulación de la expresión de GluN1 en el desarrollo. En cerebro de rata existen dos fracciones de mRNA codificante para GluN1 que tienen diferente actividad traduccional (Awobuluyi et al., 2003a). Una de estas fracciones, que representa aproximadamente la mitad del mRNA de *glun1* presente en el estadio P4, sufre un bloqueo en su traducción de manera específica mientras que el mRNA de las subunidades GluN2 sigue traduciendo activamente. Las dos fracciones de mRNA de *glun1* están distribuidas por igual en todo el cerebro y contienen todas las isoformas derivadas de GluN1, exceptuando el mRNA de GluN1-3 que se relaciona solo con la fracción cuya traducción está bloqueada. A tiempos posteriores del desarrollo (P8), comienza a traducirse progresivamente la fracción de mRNA inicialmente bloqueada, a pesar de que los niveles globales de traducción proteica en el cerebro van reduciéndose en esta etapa del desarrollo (Awobuluyi et al., 2003a).

Otro punto de control importante se ejerce a nivel del recambio, tráfico y ensamblaje de las subunidades. Así, se ha descrito que existen dos fracciones de proteínas GluN1 que son ensambladas de manera diferente a las subunidades GluN2 y que tienen distintos tipos de recambio (Chazot and Stephenson, 1997; Hall and Soderling, 1997; Hu et al., 1999; Huh and Wenthold, 1999). La mayor parte de la proteína GluN1 sintetizada queda retenida en el interior de la célula y es degradada con rapidez, y sólo una pequeña fracción tiene una vida media elevada comparable a las subunidades

GluN2 con las que interacciona (Huh and Wenthold, 1999). De hecho, sólo un 40-50% de la subunidad GluN1 sintetizada aparece en la membrana de las neuronas de hipocampo en cultivo, frente a más del 90% para las subunidades GluN2B (Hall and Soderling, 1997).

3.5. Regulación de la expresión de GluN1 asociada al proceso de excitotoxicidad.

En diversas enfermedades neurológicas crónicas se ha observado una reducción en la actividad del NMDAR y en la expresión de los genes codificantes para sus subunidades cuyo grado, además, se correlaciona con la severidad de la patología. Respecto a GluN1, se han encontrado evidencias de una disminución en los niveles de su mRNA en las enfermedades de Huntington (Arzberger et al., 1997; Luthi-Carter et al., 2003), esquizofrenia (Coyle et al., 2003), Alzheimer (Mishizen-Eberz et al., 2004) y Parkinson (Meoni et al., 1999). Nuestro grupo investigó si la sobre-estimulación por glutamato del NMDAR podría ser la causa de la disminución de GluN1 utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de excitotoxicidad (Gascon et al., 2005). Demostramos que el tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales con NMDA o glutamato da lugar a una disminución rápida y específica de los niveles de GluN1 que es causada por la inhibición de su transcripción, siendo el mecanismo de regulación estrictamente dependiente del flujo de Ca^{2+} a través del NMDAR y de la activación de NMDARs que contengan subunidades de tipo GluN2B. En un modelo de isquemia focal transitoria (MCAO) en rata observamos igualmente una importante reducción de los niveles de GluN1 y de su mRNA (Gascon et al., 2005).

Dado el escaso conocimiento de los mecanismos responsables de la inhibición de la transcripción del gen *glun1* inducida por la sobreactivación del NMDAR, en esta tesis doctoral nos propusimos avanzar en este conocimiento. Al comenzar este trabajo, sólo existían en la literatura algunos datos que indicaban que la función de algunos de los FTs que regulaban la expresión de GluN1 durante el desarrollo podían estar modificados en condiciones de excitotoxicidad, y que dichas alteraciones podrían ser fundamentales en la represión de este gen por NMDA. Hace algunos años, el grupo de S. Zukin demostró que los niveles de mRNA y proteína REST aumentaban en procesos de isquemia cerebral global (Calderone et al., 2003). La re-expresión del represor bloqueaba la actividad del promotor del gen codificante para la subunidad GluA2 del AMPAR a través de sitios RE1 y la disminución en los niveles de dicha subunidad en las neuronas destinadas a morir tras el daño isquémico. Puesto que esta subunidad limita la permeabilidad al Ca^{2+} de los AMPARs, estos cambios podrían tener efectos muy importantes sobre la viabilidad neuronal. De hecho, la inhibición de la expresión del gen *rest* previene el bloqueo de la expresión de *glua2* y rescata a las neuronas de la región CA1 del hipocampo de la muerte en un modelo *in vitro* de isquemia (Calderone et al., 2003). Es interesante que para el silenciamiento por REST de sus genes diana es necesaria la inhibición de Sp1

(Plaisance et al., 2005), habiéndose observado que en un modelo de excitotoxicidad *in vitro* se produce una disminución transitoria en los niveles de los FTs Sp1, Sp3 y Sp4 (Mao et al., 2002). En conjunto, los resultados anteriores sugerían que la pérdida de la represión de REST era probablemente un mecanismo muy importante de muerte neuronal tras el daño excitotóxico y, dado que GluN1 posee elementos RE1 en su promotor (Bai et al., 2003), una hipótesis razonable era que la inhibición de la transcripción de *glun1* pudiera estar también mediada por REST. Muy recientemente, el mismo grupo que estableció la regulación de GluA2 en isquemia ha demostrado que la hipótesis anterior era correcta, en un trabajo que discutiremos más adelante en relación a nuestros propios resultados (Noh et al., 2012).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, la estimulación de los NMDARs extrasinápticos junto con los sinápticos, tal como ocurre en una situación de excitotoxicidad, da lugar a una inhibición generalizada y dominante de la actividad de CREB, que bloquea la inducción de BDNF y está ligada a mecanismos de muerte (Hardingham et al., 2002). Es interesante resaltar que en isquemia cerebral también se ha descrito el bloqueo en la activación de CREB (Walton and Dragunow, 2000). Por tanto, dado el papel crítico de las secuencias CRE del promotor de *glun1* en su expresión (Lau et al., 2004) y su regulación por BDNF (Caldeira et al., 2007), planteamos la hipótesis de que la inactivación de CREB fuese un factor determinante en la inhibición de la transcripción de GluN1 inducida en excitotoxicidad e isquemia. Entre los mecanismos propuestos para la inactivación de CREB está la defosforilación de su serina en posición 133 (Ser133) mediada por la fosfatasa PP1, proteína que es activada en excitotoxicidad y tiene multitud de sustratos (Sala et al., 2000). Como mencionamos anteriormente, más recientemente también se ha propuesto un mecanismo de defosforilación mediado por Jacob (Dieterich et al., 2008).

Finalmente, en un modelo de neuronas ganglionares de cerebelo se ha puesto de manifiesto que el tráfico intracelular de la histona deacetilasa 4 (HDAC4) es un factor clave en la muerte neuronal, y que mientras BDNF suprime la traslocación de esta proteína al núcleo, un inhibidor de CaMK pro-apoptótico estimula su acumulación (Bolger and Yao, 2005). La sobre-expresión ectópica de una forma de HDAC4 resistente al exporte nuclear reprimió la actividad de genes reporteros regulados por elementos MEF2 y CRE, sugiriendo que HDAC4 podría inducir la muerte neuronal a través de la inactivación de FTs pro-supervivencia (Bolger and Yao, 2005). En este mismo tipo neuronal también se ha demostrado que los FTs de la familia MEF2 son regulados en condiciones de excitotoxicidad por la acción de la quinasa Cdk5 (Gong et al., 2003), modificación necesaria y suficiente para su degradación por caspasa-3 (Tang et al., 2005). Por tanto, caso de existir mecanismos similares en neuronas corticales, la represión de la actividad de los factores pro-supervivencia de las familias MEF2 y CREB podría participar en la inhibición de la transcripción de *glun1* producida en condiciones de excitotoxicidad e isquemia.

Introducción

Seguidamente, en los siguientes apartados de esta introducción revisaremos en detalle aquellos factores que podrían participar en la regulación de la transcripción de *glun1* en condiciones fisiopatológicas.

4. Proteínas reguladoras de la transcripción de *glun1*.

4.1. CREB.

La proteína CREB fue identificada en 1987 como una proteína nuclear de 43 kDa capaz de unirse a los motivos CRE del gen de la somatostatina en células PC12 (Montminy and Bilezikjian, 1987). Pertenece a una gran familia de FTs que incluye otras las proteínas activadoras como ATF-1 (*Activating Transcription Factor 1*) y CREM (*cAMP/response element modulator*), o represoras como ICER (*inducible cAMP early repressor*), y que se caracteriza por la posesión de un dominio bZIP (*basic leucine zipper domain*). En el caso de CREB este dominio se encuentra en su región C-terminal y es responsable de su unión a secuencias de 8 pb con un alto grado de conservación (TGACGTCA), denominadas motivos CRE, presentes en los promotores de los genes que regula (**Fig. 6A**) (Yamamoto et al., 1988). Este dominio también es responsable de la dimerización de esta proteína formando homo- o hetero-dímeros con CREM o ATF-1 (Schumacher et al., 2000). En la región N-terminal de CREB se encuentran dos dominios ricos en glutamina (Q1 y Q2) separados por el dominio KID (*Kinase-Inducible Domain*), que en conjunto son responsables de la interacción del FT con sus cofactores y con la maquinaria basal de transcripción (Johannessen et al., 2004). Así, por ejemplo, los dominios Q1 y Q2 interaccionan con un factor general de la transcripción TAFII130/135 (*TATA-binding protein-associated factor II 130/135*), que recluta al complejo de la RNA polimerasa y estimula la actividad transcripcional basal (Felinski and Quinn, 2001). Sin embargo, el dominio KID es una región reguladora que media la activación de la transcripción CREB-dependiente en respuesta a señales intracelulares. Contiene la Ser133 (**Fig. 6A**), cuya fosforilación es inducida por determinadas señales (**Fig. 6B**) y media el reclutamiento de los coactivadores CBP (*CREB-binding protein*) y p300 (Parker et al., 1996). La actividad intrínseca de estos coactivadores como histona acetiltransferasas (HAT) aumenta muy potentemente la transcripción de sus genes diana [revisado en (Kalkhoven, 2004)]. Mediante la acetilación de diversas lisinas presentes en una región rica en este aminoácido del extremo N- terminal de las histonas y la neutralización de su carga, las HATs dan lugar a una estructura de la cromatina más relajada, abierta y activa transcripcionalmente. Por el contrario, las HDACs son responsables de la eliminación de los grupos acetilos de las histonas y suprimen la transcripción.

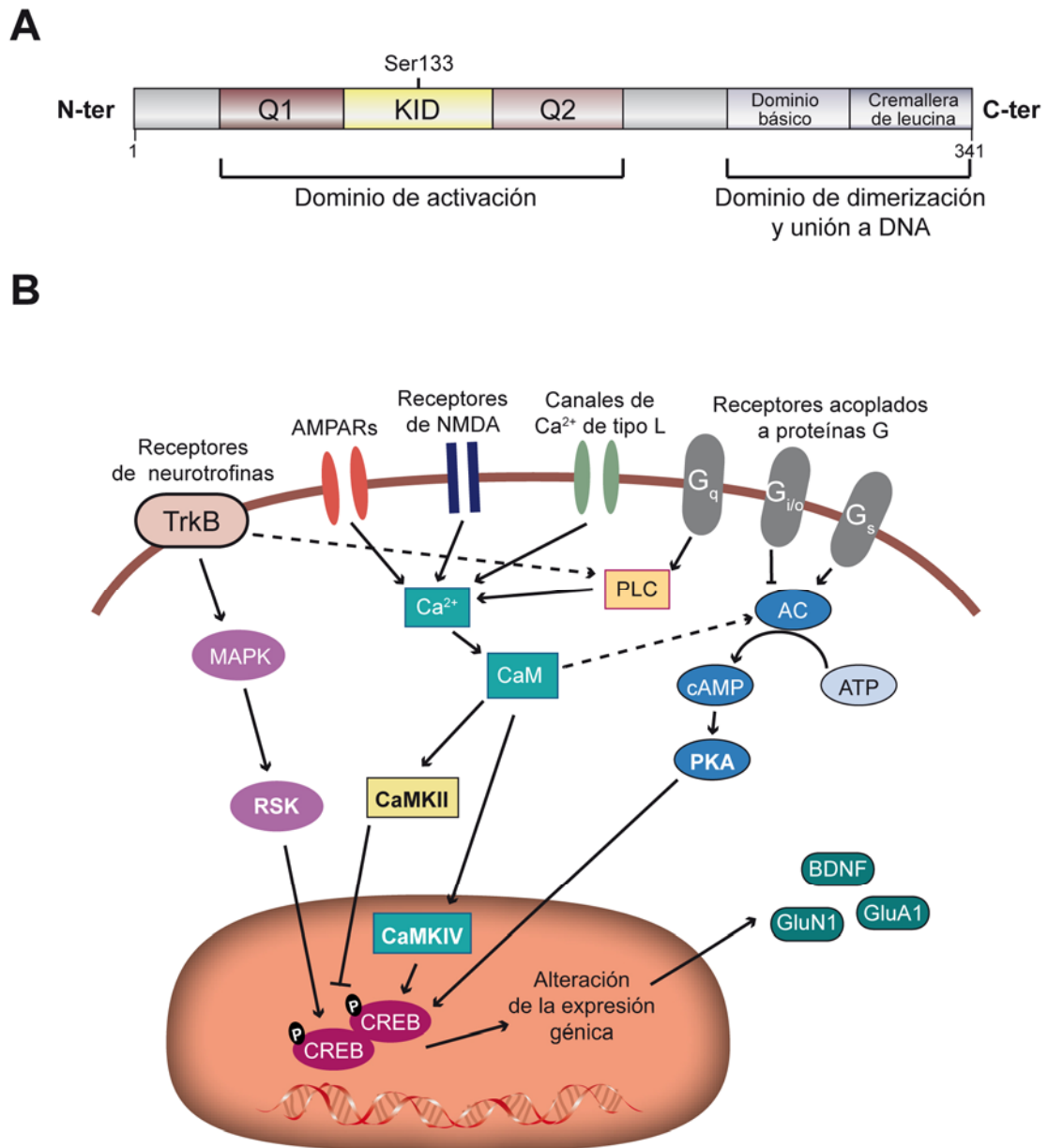


Figura 6. Estructura funcional y mecanismos de regulación de CREB. **A)** Representación esquemática de la estructura del FT CREB. El dominio de activación ocupa su mitad N-terminal y está compuesta por dos dominios ricos en glutamina, Q1 y Q2, y el dominio KID, responsable de su interacción con sus cofactores y la maquinaria de transcripción y en el que se encuentra la Ser133, susceptible de fosforilación por numerosas quinasas. Hacia el extremo C-terminal se localiza una región de dimerización y unión al DNA, compuesta por un dominio básico bZIP y un dominio de cremallera de leucina. *Adaptada de:* (Johannessen and Moens, 2007). **B)** Esquema de los principales eventos implicados en la regulación de CREB. Diversos neurotransmisores y neurotrofinas actúan mediante su unión a receptores en la membrana como son los AMPARs, NMDARs, los receptores acoplados a proteínas G, receptores TrkB o canales de Ca^{2+} de tipo L. Esta unión pone en marcha distintas cascadas de señalización intracelular que desembocan en la fosforilación de CREB, principalmente en la Ser133. La fosforilación de esta serina activa la transcripción de genes neuronales, entre los que se encuentran *bdnf*, *gluA1* o *gluN1*. Varias de las vías de señalización representadas confluyen en el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que activa a la calmodulina (CaM), capaz de modular a CaMKIV, que fosforila y activa CREB, o CaMKII, que inhibe su activación. El FT CREB también puede ser fosforilado y activado por la proteína RSK, activada a través de MAPKs por la vía BDNF/TrkB, o PKA, activada a través de la adenilato ciclasa (AC) por receptores acoplados a proteínas G. Las líneas continuas indican activaciones o inhibiciones, y las discontinuas interacciones entre las distintas vías de señalización. *Adaptada de:* (Carlezon et al., 2005).

Sin embargo, como veremos, las histonas no son las únicas proteínas capaces de sufrir procesos de acetilación y deacetilación en sus residuos de lisina, y también están sometidos a estas modificaciones algunos FTs, como por ejemplo CREB y MEF2, proteínas del citoesqueleto, chaperonas y factores de importe nuclear (Glozak et al., 2005).

La fosforilación de la Ser133 se produce por múltiples quinasas entre las que destacan la PKA, CaMKs II/IV, MAPKs y Akt (también conocida como PKB o proteína quinasa B), que median la fosforilación de CREB en respuesta a diferentes estímulos y/o distintos tipos celulares (**Fig. 6B**) (Gonzalez and Montminy, 1989; Lonze and Ginty, 2002; Mayr and Montminy, 2001; Sun et al., 1994). En neuronas, la liberación de glutamato en la sinapsis provoca la entrada de Ca^{2+} a través de receptores de glutamato y canales de Ca^{2+} , seguida de la activación de la quinasa IV dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKIV) y la fosforilación de CREB en su Ser133. Adicionalmente, este ion activa la vía Ras/MAPK que da lugar a la activación de la familia de quinasas RSK (*90 kDa ribosomal S6 kinase*) y la fosforilación de CREB en igual residuo. Sin embargo, mientras que la fosforilación por CaMKIV se produce de manera rápida y transitoria después de la despolarización de la membrana, la debida a las MAPKs es posterior y se mantiene en el tiempo (Dolmetsch et al., 2001; Wu et al., 2001a). Aunque la fosforilación de CREB en la Ser133 es crucial para la inducción por Ca^{2+} de la transcripción dependiente de este FT, no es suficiente en algunas circunstancias, sugiriendo la necesidad de que CREB sufra fosforilaciones o modificaciones adicionales (Gau et al., 2002; Kornhauser et al., 2002). Así, en respuesta a la entrada de Ca^{2+} , CREB resulta fosforilado en las Ser142 y 143, junto a la Ser133, y ello contribuye a la activación de la transcripción de forma específica. La mutación Ser/Ala de los residuos 142 y 143 inhibe la actividad de CREB en respuesta a la depolarización, sin embargo no afecta a la transcripción inducida por el cAMP (Kornhauser et al., 2002). Adicionalmente, es muy interesante que la fosforilación de los residuos Ser142 y 143 inhibe la capacidad de pCREB Ser133 (a la que por simplicidad nos referiremos como pCREB) para unirse con CBP (Parker et al., 1998). Esto sugiere la posible implicación de coactivadores distintos de CBP o p300 en la función de CREB. Algunos de esos coactivadores podrían ser los TORCs (*transducers of regulated CREB activity*), también conocidos como CRTCs (*CREB-regulated transcription coactivators*) 1-3, que se unen al dominio bZIP de CREB en lugar de a KID (Conkright et al., 2003). En condiciones basales TORC 1 y 2 se encuentran secuestradas en el citoplasma gracias a su interacción con la chaperona 14-3-3 (Screaton et al., 2004). La activación de la fosfatasa Ca^{2+} -dependiente PP2B (*Protein Phosphatase 2B*) o calcineurina (CaN), junto con la inhibición mediada por cAMP de la quinasa SIK2 (*salt-inducible kinase* 2), produce la defosforilación e importe nuclear de TORC 1 y 2 y su unión y activación de CREB, favoreciendo la transcripción dependiente de este FT (Sasaki et al., 2011). De acuerdo con el papel propuesto, la ausencia de TORC 1 disminuye la supervivencia neuronal después de un proceso isquémico (Sasaki et al., 2011).

Existe una cierta controversia acerca de si CREB necesita fosforilarse para unirse a los CREs de sus genes diana o se fosforila una vez unido a dichos elementos. Tradicionalmente se ha propuesto que, en condiciones basales, es una forma inactiva de CREB la unida a los CREs de los promotores y que, sólo tras su fosforilación, se activa la transcripción de sus genes diana (Mayr and Montminy, 2001). Sin embargo, otros resultados muestran que en algunos tipos celulares la fosforilación de la Ser133 podría ser necesaria para la unión de CREB a los sitios CRE de los genes que regula (Cha-Molstad et al., 2004). En cualquier caso, la defosforilación de la Ser133 de pCREB producida por las proteínas fosfatasa PP1 (Alberts et al., 1994) o PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) (Wadzinski et al., 1993) devolvería a CREB a un estado inactivo y, por tanto, produciría la inhibición de la transcripción de sus genes diana. Además de la fosforilación, se ha propuesto que otros mecanismos regulan la función de CREB, como por ejemplo la acetilación mediada por CBP de sus Lys91, 94 y 136 presentes en los dominios Q1 y KID (Lu et al., 2003). Esta modificación promovería el aumento de la transcripción de distintos genes por mecanismos todavía sin definir, aunque se han postulado cambios estructurales que podrían prolongar el estado fosforilado de CREB al reducir la atenuación de su actividad por las fosfatasa (Michael et al., 2000). Finalmente, también existe alguna evidencia de que la heterodimerización de CREB no fosforilado con una forma dominante negativa del FT (A-CREB) o con ICER da lugar a su degradación por mecanismos desconocidos, y que la fosforilación de CREB previene esta degradación *in vitro* e *in vivo* (Mouravlev et al., 2007). Es interesante que ICER es uno de los genes diana de pCREB (Molina et al., 1993), lo que sugiere un mecanismo de autorregulación entre la expresión de CREB y la de sus represores.

En el SNC de mamíferos, CREB tiene un papel fundamental en la formación de la memoria y la plasticidad sináptica, procesos mediante los cuales las neuronas convierten las señales ambientales en respuestas genómicas necesarias para su adaptación a largo plazo. Así, por ejemplo, la defosforilación de la Ser133 de pCREB en el hipocampo mediada por las fosfatasa PP1 y PP2A está asociada a la inducción de la LTD (Mauna et al., 2010). Adicionalmente, la interacción de CREB con los CREs es importante en la formación de algunos tipos de memoria a largo plazo (Impey et al., 1998). Por otra parte, en ratones que expresan una forma constitutivamente activa de CREB (VP16-CREB) la consolidación de la LTP se encuentra facilitada a través de la regulación de genes neuronales específicos (Barco et al., 2002). Otras funciones críticas de este FT son las relacionadas con el control de la supervivencia y muerte neuronales. Así, por ejemplo, la inhibición de la función de CREB mediante la sobre-expresión de un mutante dominante negativo (Ser133Ala) aumenta la muerte neuronal por apoptosis y la neurodegeneración de la corteza cerebral (Ao et al., 2006). Sin embargo, la sobreactivación de una manera crónica de CREB resulta nociva para las neuronas ya que se induce su muerte por excitotoxicidad (Valor et al., 2010), mostrando la importancia de la estricta regulación de la expresión génica dependiente de este FT para la supervivencia y función neuronales.

Finalmente, cabe resaltar que diversas alteraciones en la función del FT CREB han sido observadas en numerosas enfermedades del SNC incluyendo la isquemia cerebral, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, la Corea de Huntington o la esquizofrenia (Carlezon et al., 2005; Chalovich et al., 2006; Ma et al., 2007; Nucifora et al., 2001; Walton and Dragunow, 2000). Como mencionamos anteriormente, la activación de este FT está bloqueada tras el daño isquémico (Walton and Dragunow, 2000). Por el contrario, en modelos de tolerancia isquémica inducida por preconditionamiento, la activación de CREB mediada por las quinasas CaMKII y IV juega un importante papel neuroprotector a través de la inducción de sus genes diana (Mabuchi et al., 2001).

4.2. MEF2.

Las proteínas MEF2 son miembros de la familia de FTs denominados MADS (Naya and Olson, 1999; Yu et al., 1992) y fueron descubiertas originalmente por su papel en la diferenciación muscular (Molkentin et al., 1995), aunque también tienen funciones prominentes en el SN. Los cuatro miembros de la familia (MEF2A-D) presentan patrones de expresión propios pero también solapantes en las neuronas, tanto durante el desarrollo embrionario como en el SNC adulto (Leifer et al., 1993; Lyons et al., 1995). Poseen un dominio de 56 aminoácidos en su extremo N-terminal denominado MADS-*box*, que es un motivo de unión a DNA de baja afinidad estructuralmente muy conservado en todos los miembros de la familia (**Fig. 7A**). A continuación se encuentra una secuencia de 29 aminoácidos conocida como dominio MEF2, que media las uniones de alta afinidad al DNA y la homo- y hetero-dimerización de las proteínas MEF2 con otros miembros de la familia. Estos dos últimos dominios son necesarios y suficientes para la unión de MEF2 al DNA, principalmente en secuencias CTA (A/T)₄ TAG/A (Black and Olson, 1998). También se han definido dos dominios responsables de la transactivación (TAD1 y TAD2), diversos sitios de fosforilación y una NLS, específica de la isoforma A (**Fig. 7A**) (McKinsey et al., 2002).

La actividad transcripcional de MEF2 es muy sensible a diversas modificaciones postraduccionales, que sufre en respuesta a diferentes estímulos y que regulan su interacción con diversos cofactores transcripcionales (McKinsey et al., 2002; Shalizi et al., 2006). De esta forma, MEF2 puede actuar como un activador o como un represor de la transcripción, dependiendo de la cascada de señalización activada por el estímulo concreto, pudiendo además alternar entre estos dos estados. En su estado represor, las HDACs de clase IIa interaccionan específicamente con los dominios MADS y MEF2 de las proteínas MEF2 (Lemercier et al., 2000). Esta interacción contribuye a la represión de la transcripción dependiente de MEF2, tanto por la reducción de la acetilación de las histonas en los promotores de sus genes diana como por la deacetilación de un residuo clave en MEF2, la Lys403 (numeración referida al FT MEF2A de humanos) (Shalizi et al., 2006) (**Fig. 7A**).

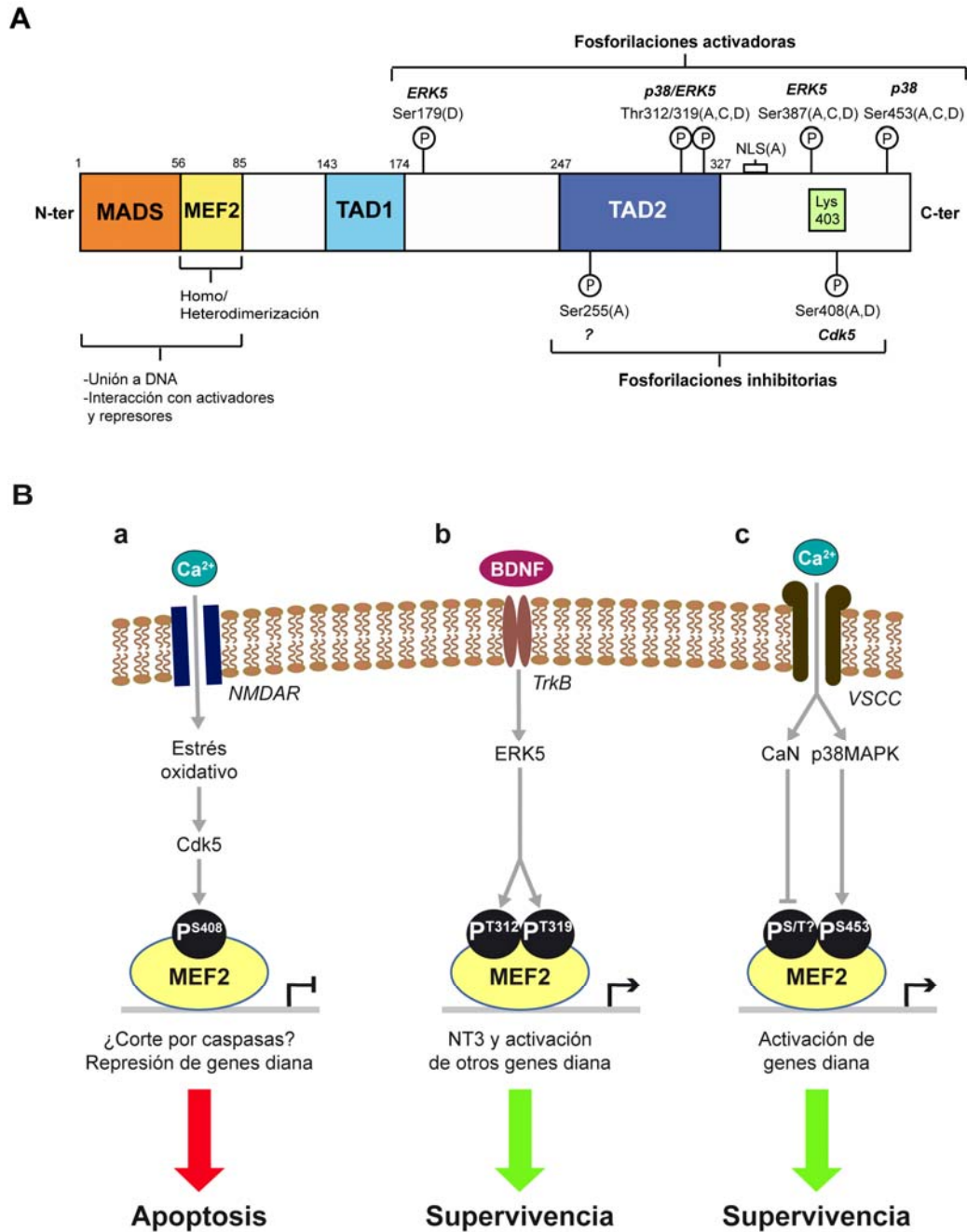


Figura 7. Esquema estructural de MEF2 y principales vías de señalización en que participa. **A)** Representación esquemática de la organización en dominios de MEF2 y de sus modificaciones reguladoras. En su extremo N-terminal contienen dominios MADS y MEF2 muy conservados que constituyen una región de unión al DNA, homo- y heterodimerización con otras proteínas MEF2 o FTs de tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*) o interacción con distintos co-activadores o represores. Otros dominios importantes son los responsables de la transactivación transcripcional (TAD1 y TAD2), y una NLS, específica de la isoforma A. MEF2 es sustrato de diversas proteínas quinasas que regulan tanto la unión al DNA como la actividad transcripcional. Se muestran las fosforilaciones activadoras en la parte superior del esquema y las inhibitorias en la parte inferior, señalándose en cada caso el residuo modificado y la isoforma particular de MEF2 en que ocurre. También se indica el residuo Lys403 (cuadrado verde) modificado por acetilación y sumoilación. La numeración está referida a la secuencia de MEF2A humana. *Adaptada de:* (Heidenreich and Linseman, 2004). **B)** Esquema representativo de algunas de las vías de señalización en las que MEF2 está implicado. **a**, un estímulo excitotóxico promueve apoptosis debido al estrés oxidativo, a través de la fosforilación por Cdk5 de MEF2 (S408). Dicha fosforilación bloquea la transcripción de genes dependientes de MEF2 y puede regular el procesamiento por caspasas. **b**, el BDNF promueve la supervivencia neuronal a través de la activación de ERK5. La fosforilación de MEF2 por ERK5 (T312/T319) en neuronas recién formadas favorece la transcripción de genes diana neuronales en respuesta a la estimulación por BDNF, incluyendo el de neurotrofina 3 (NT3). **c**, la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} activa la fosfatasa calcineurina (CaN) y la quinasa p38, y ambas promueven la transcripción de genes pro-supervivencia mediante la fosforilación de MEF2 por p38 (S453) y la defosforilación por CaN. De nuevo, la numeración está referida a la secuencia de MEF2A humana. *Tomada de:* (Shalizi and Bonni, 2005).

Introducción

La deacetilación de este residuo se correlaciona con su sumoilación (SUMO, *small ubiquitin-like modifier*), modificación que al parecer estabiliza a MEF2 en un estado de represor transcripcional (Shalizi et al., 2006; Zhao et al., 2005).

Las vías calcio-dependientes inducidas por la actividad neuronal activan la transcripción de genes dependientes de MEF2 mediante varios mecanismos distintos. En primer lugar, la fosforilación de las HDACs a través de la activación de las CaMKs conduce a la liberación de su interacción con MEF2 y su exporte desde el núcleo (Chawla et al., 2003; Lu et al., 2000). Como las HDACs compiten con las HATs CBP y p300 por la unión a las mismas secuencias de MEF2 (**Fig. 7A**), la disociación del complejo HDAC-MEF2 promueve el reclutamiento de coactivadores y la activación de la transcripción (McKinsey et al., 2001). Por otra parte, la activación de p38-MAPK dependiente de calcio conduce a la fosforilación de las distintas isoformas de MEF2 en múltiples sitios (Han et al., 1997; Yang et al., 1999; Zhao et al., 1999) (**Figs. 7A y B**). Esta quinasa fosforila al menos tres sitios conservados en las isoformas MEF2A, C y D (Thr312, Thr319 y Ser453), contribuyendo a la activación transcripcional de MEF2 (Yang et al., 1999) (**Fig. 7A**). Adicionalmente, la MAPK ERK5 también es capaz de fosforilar MEF2A, C y D, en respuesta al tratamiento con BDNF (**Fig. 7B, parte b**) (Kato et al., 1997; Shalizi et al., 2003). En el caso de MEF2A, ERK5 fosforila y activa al FT a través de sus residuos Thr312 y Thr319 (Kato et al., 2000), también fosforilables por p38, y Ser387 (Yang et al., 1998). Para MEF2D, las fosforilaciones tienen lugar en la Ser179 (Kato et al., 2000) y Ser387, esta última altamente conservada en MEF2C (Kato et al., 1997). Se ha demostrado que la activación de MEF2C mediada por BDNF a través de ERK5, tiene un papel importante en la supervivencia de las neuronas corticales durante el desarrollo (Liu et al., 2003). Por último, la activación dependiente de calcio de la fosfatasa calcineurina conduce a la defosforilación de determinados residuos de Ser y Thr en MEF2 (Mao and Wiedmann, 1999; Wu et al., 2001b), conservados en las isoformas A y D (**Fig. 7B, parte c**). Particularmente, la defosforilación de la Ser408 es muy importante en el cambio de MEF2 desde un estado de represor a otro de activador transcripcional ya que se requiere para que se produzca el cambio en la Lys403, mencionada anteriormente, desde su forma sumoilada a la acetilada (Gregoire et al., 2006; Shalizi et al., 2006). Finalmente, es interesante resaltar que mientras que Ca^{2+} y cAMP cooperan en la activación de CREB, el cAMP puede inhibir la activación de MEF2D mediante el bloqueo del exporte de la HDAC5 desde el núcleo y la inhibición del importe del co-activador de MEF2 NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) c3/c4 (Belfield et al., 2006). En ausencia de cAMP, la actividad sináptica induce la defosforilación de las proteínas de la familia NFAT por calcineurina y su traslocación desde el citoplasma al núcleo, donde interactúan con MEF2A y D (Blaeser et al., 2000) y permiten el reclutamiento de p300/CBP (Youn et al., 2000) y la activación de la transcripción dependiente de MEF2.

Como acabamos de mencionar, los FTs MEF2 pueden ser activados por la acción de neurotrofinas

así como por el flujo de calcio resultante de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis (**Fig. 7B, partes b y c**). En el desarrollo, la función de MEF2 es muy importante porque restringe el número y función de las sinapsis excitatorias en las neuronas de hipocampo en relación con el nivel de actividad sináptica (Barbosa et al., 2008; Flavell et al., 2006; Pulipparacharuvil et al., 2008; Shalizi et al., 2006). El control ejercido por MEF2 en el desarrollo de las sinapsis deriva del programa de expresión génica dependiente de este FT, una vez que es activado por la entrada de Ca^{2+} , y su regulación de más de 180 genes dianas (Flavell et al., 2008). Otras funciones igualmente importantes de los miembros de la familia MEF2 son la regulación de la supervivencia neuronal durante el desarrollo (Mao et al., 1999) y la adaptación del comportamiento tras el abuso de drogas (Pulipparacharuvil et al., 2008).

El papel de las distintas isoformas de MEF2 en el cerebro ha sido estudiado *in vivo* mediante ratones KO (*knockout*) (Akhtar et al., 2012; Barbosa et al., 2008). La delección de forma condicionada del gen en el *mef2C* en cerebro aumentaba mucho el número de sinapsis excitatorias, potenciándose la transmisión sináptica basal o potenciada, pero dando lugar a graves defectos en los procesos de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo (Barbosa et al., 2008). Recientemente, este mismo grupo ha observado que la delección de *mef2A* en el cerebro no afecta al comportamiento, incluyendo procesos de memoria y aprendizaje, que tampoco se ven afectados en los animales doble KO para *mef2A* y *mef2D*, si bien éstos presentan problemas en la coordinación motora y un aumento de la plasticidad sináptica a corto plazo en el hipocampo (Akhtar et al., 2012). El análisis del triple mutante *mef2A*, *mef2C* y *mef2D* mostró, sin embargo, una muerte postnatal temprana con incremento de la apoptosis neuronal, resultado que indica un papel redundante de las tres isoformas de MEF2 en el control de la supervivencia neuronal. Sin embargo, mientras que MEF2A y MEF2D solo tienen funciones sutiles, MEF2C parece ser la principal isoforma involucrada en la regulación de la función sináptica en el hipocampo (Akhtar et al., 2012).

Algunos estudios han implicado a diferentes isoformas de MEF2 en procesos relacionados con la excitotoxicidad. En neuronas corticales se ha demostrado que la vía de señalización p38-MEF2 que, como acabamos de ver, tiene un papel importante en supervivencia neuronal durante el desarrollo, puede convertirse en pro-apoptótica en las neuronas maduras sometidas a excitotoxicidad u otros tipos de estrés (**Fig. 7B, parte a**). En estas condiciones se produce la activación de las caspasas-3 y 7 que procesan MEF2A, C y D tanto *in vitro* como en un modelo de isquemia focal (Okamoto et al., 2002a). Este procesamiento genera fragmentos de estos FTs que preservan el dominio de unión al DNA pero tienen truncado el dominio de transactivación, por lo que interfieren de forma dominante la transcripción dependiente de este FT. También se ha descrito un proceso en el que las caspasas, de manera concertada con la quinasa Cdk5, regulan la función de MEF2 para ejecutar procesos de apoptosis neuronal (Gong et al., 2003). Esta quinasa funciona fundamentalmente en neuronas

postmitóticas gracias a los elevados niveles de sus activadores p35/p39, y participa en el desarrollo del SNC. Sin embargo, su activación anómala, por ejemplo en situaciones de estrés oxidativo, ha sido relacionada con la muerte neuronal, proceso en el que es importante el procesamiento por calpaína de su activador p35 para dar una forma p25 de mayor actividad. Entre sus muchos sustratos, Cdk5 fosforila a MEF2A y MEF2D (en sus residuos Ser408 y Ser444, respectivamente), pero no a MEF2C. Dicha fosforilación es necesaria y suficiente para promover su degradación por casapasa-3 en neuronas granulares de cerebelo e inhibir su función, contribuyendo a su muerte por apoptosis (**Fig. 7B, parte a**) (Tang et al., 2005). Por último, muy recientemente se ha demostrado que también la proteasa calpaína, activada en procesos de excitotoxicidad e isquemia, es capaz de inactivar la isoforma MEF2D (Wei et al., 2012), trabajo que será discutido más adelante en relación a nuestros propios resultados.

4.3. ERK5.

En el año 1995 dos grupos clonaron simultáneamente la proteína ERK5. Por una parte, Zhou et al. (1995), identificaron la MAPK/ERK MEK5 y, basándose en una previsible interacción con sus sustratos, descubrieron ERK5 en un ensayo de dos híbridos (Zhou et al., 1995). Al mismo tiempo, otro grupo identificó una proteína a la que llamaron BMK1 (*big MAPK 1*) (Lee et al., 1995) porque tenía 816 aminoácidos y una masa molecular de 98 kDa, es decir, el doble que las MAPKs conocidas (40-50 kDa). Este mayor tamaño es debido a la existencia de una secuencia C-terminal única y característica de 396 aminoácidos en esta proteína. Además de ERK5, la familia de las MAPKs/ERKs convencionales incluye a ERK1/2, JNK 1-3 y p38-MAPK α , β , γ y δ . En general, esta familia de proteínas participa en procesos tan importantes como la proliferación, diferenciación y migración celulares, así como en la expresión génica, y son activadas por una variedad de estímulos que incluyen factores de crecimiento, agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), citoquinas o estrés ambiental.

El dominio catalítico de ERK5 se encuentra en su parte N-terminal (aminoácidos 54-346) y está muy conservado, siendo su homología del 50% respecto a las proteínas ERK1/2 (**Fig. 8A**). Además, esta región N-terminal contiene el motivo de activación Thr–Glu–Tyr (TEY), una secuencia que interviene en el transporte nuclear (aminoácidos 1-77) (Buschbeck and Ullrich, 2005), las secuencias responsables de su asociación con MEK5 (aminoácidos 78-139) y de su oligomerización (aminoácidos 140-406) (Yan et al., 2001). Por otra parte, la porción C-terminal es esencial para la actividad de ERK5 ya que media su traslocación al núcleo mediante la presencia de una secuencia NLS (aminoácidos 505-539) (Kondoh et al., 2006; Yan et al., 2001) y dos secuencias ricas en prolina (PR1 y PR2), que sirven para la unión de proteínas con dominios SH3 (*Src-homology 3*) y median la interacción con MEF2 (aminoácidos 434-446 y 578-709) (**Fig. 8A**). Además, en el extremo C-terminal también se

encuentra un potente dominio de activación transcripcional (aminoácidos 664-789) (Kasler et al., 2000), único en la familia de las MAPKs y activado por la autofosforilación de la propia proteína (Morimoto et al., 2007), que junto a PR1 y PR2 es necesario para la activación de MEF2D por ERK5 (Kasler et al., 2000). La región C-terminal tiene además una función auto-inhibitoria y su delección aumenta la actividad de ERK5 (Buschbeck and Ullrich, 2005).

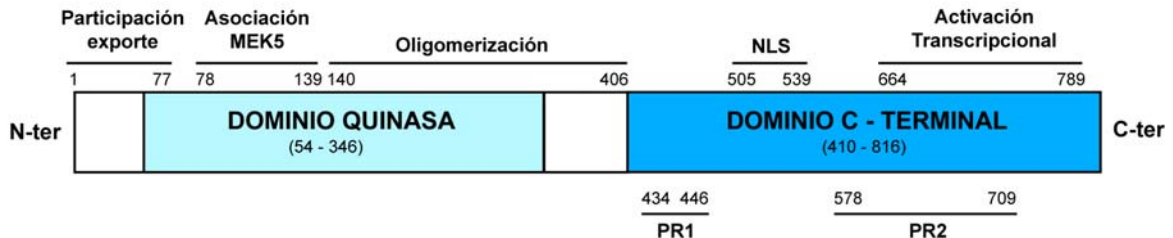
La proteína ERK5 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma (Buschbeck and Ullrich, 2005) y se ha propuesto un modelo para explicar el transporte nucleocitoplásmico de esta proteína y su activación (Kondoh et al., 2005) resumido en la **figura 8B**. Las secuencias N-terminales de ERK5 no contienen propiamente una NES (*Nuclear Export Sequences*), pero se piensa que mediante su interacción con el extremo C-terminal podría constituirse una secuencia NES capaz de mantener a esta proteína en el citoplasma (**Fig. 8B**) (Nishimoto and Nishida, 2006). Otra posibilidad es que estas secuencias del extremo C-terminal de ERK5 medien su interacción con alguna proteína que si que contenga dicha secuencia. En cualquier caso, en células en reposo, la función de la secuencia NES preponderaría sobre la NLS y ERK5 estaría en el citoplasma. En respuesta a factores de crecimiento, aumenta la actividad de ERK5 debido a la fosforilación dual de su motivo TEY por la MAPKK MEK5, al parecer la única quinasa capaz de activar a ERK5, que lo hace de forma específica (Mody et al., 2003). Una vez activada por MEK5, ERK5 fosforila su propio extremo C-terminal en la Thr723 y en una región que contiene tres serinas (Ser760, Ser764 y Ser766) (Morimoto et al., 2007). Ello produciría un cambio conformacional en ERK5, que rompería la interacción entre sus regiones N- y C-terminales, pasando a exponer su dominio quinasa y la secuencia NLS, y pudiendo entrar al núcleo y fosforilar FTs como MEF2, promoviendo la transcripción de genes pro-supervivencia. En concreto, tanto *in vitro* como *in vivo*, ERK5 es capaz de activar a MEF2A, MEF2C y MEF2D (Kato et al., 2000; Yoon et al., 2005) y se comporta como una quinasa-coactivadora, capaz de aumentar la actividad transcripcional de MEF2 de dos maneras, mediante su fosforilación y el aumento de su actividad transcripcional gracias a su potente dominio C-terminal descrito anteriormente (Kasler et al., 2000).

Recientemente se han desarrollado dos inhibidores específicos para la vía MEK5/ERK5, BIX02188 y BIX02189, que inhiben la actividad catalítica de MEK5 (Tatake et al., 2008). Gracias a ellos se está empezando a clarificar el papel de ERK5 en la fisiología neuronal y las rutas de señalización en las que participa específicamente, diferenciándolo del desempeñado por otras MAPKs. Sin embargo, la función de ERK5 en el SNC no está todavía muy bien definida. En contraste con ERK1 y 2, activadas por neurotrofinas, cAMP o actividad sináptica, ERK5 sólo responde a neurotrofinas. De hecho, ERK5 ejerce un papel crítico en la promoción mediada por BDNF de la supervivencia de las neuronas en desarrollo, aunque no de las neuronas maduras (Liu et al., 2003). La activación de ERK5 por BDNF en neuronas corticales en desarrollo ocurre a través de la quinasa Rap-1 y MEKK2, una quinasa de MEK5 (Wang et al., 2006b). En relación con el patrón temporal mencionado anteriormente, la expresión de

Introducción

ERK5 en cerebro de rata es elevada durante el desarrollo embrionario pero disminuye a medida que el cerebro madura hasta que sus niveles son casi indetectables a día P49 (Liu et al., 2003). En neuronas granulares recién nacidas también se ha descrito que el tratamiento con BDNF induce específicamente la vía ERK5/MEF2, y que este FT induce la transcripción de la neurotrofina NT-3 que participa en los mecanismos antiapoptóticos (Shalizi et al., 2003).

A



B

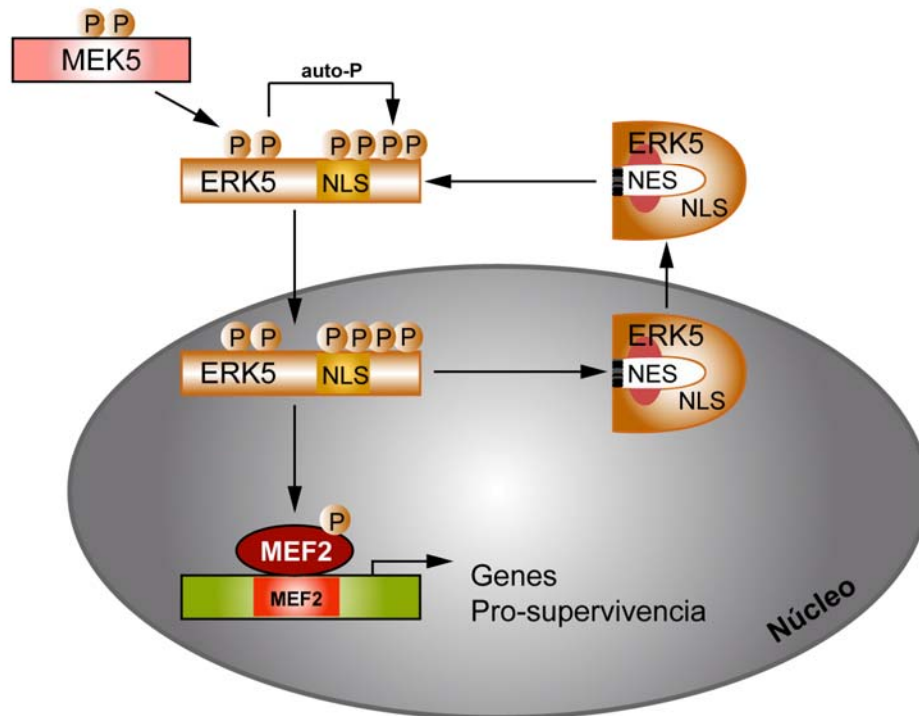


Figura 8. Estructura de ERK5 y mecanismo de activación y transporte núcleo-citoplásmico. A) Representación esquemática de la organización en dominios de la proteína ERK5. La porción N-terminal posee el dominio quinasa, que contiene el motivo de activación Thr-Glu-Tyr (TEY), una secuencia importante para la localización citoplasmática (NES), y las secuencias responsables de su asociación con MEK5 y su oligomerización. Por otra parte, el dominio C-terminal posee una secuencia NLS, dos secuencias ricas en prolina (PR1 y PR2), responsables de la interacción con los FTs MEF2 y, por último, un potente dominio de activación transcripcional, único para este miembro de la familia de las MAPK. **B)** Mecanismo molecular de la activación y transporte núcleo-citoplásmico de ERK5. En situación de reposo, se produce una interacción entre secuencias de los extremos N- y C-terminales de ERK5 que, juntas, constituyen una secuencia de exporte nuclear (NES) que mantiene a esta proteína en el citoplasma. Tras la estimulación celular, la fosforilación de ERK5 por MEK5 en el motivo TEY, cerca del extremo N-terminal, da lugar a su autofosforilación en el residuo Thr723 y en una región que contiene tres serinas (Ser760, Ser764 y Ser766) cerca de su extremo C-terminal. Se produce entonces un cambio conformacional que destruye la NES y expone el dominio quinasa de ERK5 y su NLS, responsable de su entrada de ERK5 al núcleo y la fosforilación de FTs como MEF2, que promueve la transcripción de genes pro-supervivencia. *Adaptada de:* (Nishimoto and Nishida, 2006).

En otro ejemplo, ERK5 se activa durante el transporte retrógrado de los complejos NGF-TrkA hacia el cuerpo neuronal en las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), acción que evita la apoptosis (Watson et al., 2001). En este estudio también se observó la fosforilación de CREB, aunque todavía está por definir si este FT es un sustrato *bona fide* de ERK5. Más recientemente, se ha demostrado la estimulación por neurotrofinas de un conjunto amplio de genes de respuesta retrógrada en el DRG, incluyendo *bcl-x*, codificante para una proteína anti-apoptótica de la familia de Bcl-2, y *mef2d*, que promueven la supervivencia de las neuronas sensoriales (Pazyra-Murphy et al., 2009).

Algunos estudios han caracterizado *in vivo* la función fisiológica de ERK5. Así por ejemplo, la delección del gen *erk5* en ratones KO fue letal en la etapa embrionaria (E9,5-10,5) por causa de defectos cardiovasculares, que implican a ERK5 en el desarrollo del corazón (Hayashi and Lee, 2004). Un mutante condicional en células endoteliales mostró defectos cardiovasculares similares, lo que sugiere que éstos son consecuencia de una vasculogénesis y angiogénesis anormales (Hayashi et al., 2004). Aunque los resultados *in vitro* indican que ERK5 juega un papel crítico en la supervivencia y desarrollo neuronales, como se describió anteriormente, los mutantes condicionales de ERK5 en neuronas se desarrollaron normalmente y sobrevivieron de manera similar a los ratones control (Hayashi and Lee, 2004). Esta sorprendente observación podría ser debida a la activación en neuronas de vías intracelulares alternativas para compensar la pérdida del gen *erk5*.

Hasta la fecha no se ha estudiado con demasiado detalle la implicación de ERK5 en la patología isquémica. Utilizando modelos de preconditionamiento isquémico se ha descrito la activación selectiva de ERK5 en la región CA3/DG del hipocampo, donde actúa como una señal de supervivencia neuronal tras el daño isquémico (Wang et al., 2005). La activación de ERK5 y su efecto neuroprotector también se ha observado también en la región CA1 tras el preconditionamiento, y se ha relacionado con aumentos moderados en la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs (Wang et al., 2006a). Este mismo grupo ha estudiado en detalle el papel del FT MEF2C en los procesos de isquemia cerebral después de un preconditionamiento isquémico. En isquemia sin preconditionamiento, MEF2C se activa significativamente alcanzándose un máximo a los 30 min de perfusión, si bien ERK5 no es la quinasa responsable. En fases tardías de la perfusión (3-5 días) se produce una acusada disminución de los niveles de proteína MEF2C. Por el contrario, tras el preconditionamiento isquémico MEF2C se activa fuertemente en la región CA1 del hipocampo durante estadios tardíos de la perfusión (6 h-5 días), siendo ERK5 la quinasa responsable de su activación (Wang et al., 2009). Los resultados anteriores establecieron que la vía de señalización ERK5-MEF2C está activada en la región CA1 del hipocampo tras el preconditionamiento isquémico, y que desempeña un papel crítico en la mediación de sus acciones anti-apoptóticas y neuroprotectoras.

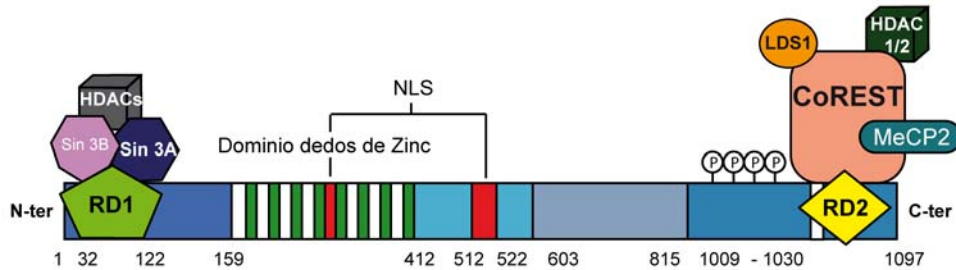
4.4. REST.

Las proteínas NRSF y REST fueron descubiertas de manera independiente por su capacidad de unirse respectivamente a los elementos reguladores de la transcripción NRSE y RE1, aunque pronto se llegó a la conclusión de que ambas secuencias y sus proteínas interaccionantes eran iguales (Mori et al., 1992). La proteína REST es un factor de transcripción de silenciamiento génico, expresado muy abundantemente durante la embriogénesis y crítico para el establecimiento del fenotipo neuronal. Esta proteína posee 1097 aminoácidos y un tamaño molecular de unos 122 kDa, y está compuesta por diversos dominios funcionales que se resumen en la **figura 9A**. En primer lugar, REST posee un dominio de unión a secuencias específicas en el DNA, fundamentalmente secuencias canónicas RE1, que contiene ocho motivos en forma de dedo de zinc, y además, dos NLSs. Adicionalmente, en sus extremos N- y C-terminales, REST contiene dos dominios represores independientes (RD1 y RD2, respectivamente) (Tapia-Ramirez et al., 1997). El primero de ellos recluta a la proteína mSin3A, un co-represor que ayuda a REST en su función represora y que, a su vez, recluta HDACs para formar un complejo de represión (Grimes et al., 2000; Huang et al., 1999; Naruse et al., 1999). Sin embargo, mSin3A es inadecuado para el silenciamiento de genes a largo plazo y existe otro co-represor de REST más especializado, que se denomina CoREST (Andres et al., 1999; Ballas et al., 2001), que actúa como proteína de andamiaje para reclutar y formar complejos con HDAC1/2 (Ballas et al., 2001; Humphrey et al., 2001; You et al., 2001). Una vez asociado con REST, CoREST capta numerosas proteínas como la histona demetilasa LSD1 (histona H3 K4 demetilasa), las histonas metiltransferasas G9A y SUV39H1 (histona H3 K9 metiltransferasa), una proteína de unión a sitios CpG metilados (MeCP2), o un componente del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, Brg1 (Andres et al., 1999). La proteína REST también se asocia con un gran número de cofactores epigenéticos y reguladores que incluyen metiltransferasas de DNA (DNMTs), enzimas de remodelación de la cromatina, las subunidades de mediador transcripcional de la RNA polimerasa II (Med-19 y -26) (Ding et al., 2009), el factor de unión al NADH (CtBP) (Garriga-Canut et al., 2006; Guardavaccaro et al., 2008), el FT Sp3 (Kim et al., 2006), o la fosfatasa SCP1 (*small C terminal domain phosphatase*) (Visvanathan et al., 2007).

Anteriormente se consideraba que la única función de REST era la represión de forma coordinada de la expresión de genes neuronales en las células no-neuronales y en las progenitoras embrionarias antes de su diferenciación neuronal (**Fig. 9B**) (Ballas and Mandel, 2005). De acuerdo con ello, en los progenitores neuronales pluripotentes, REST reprime activamente la expresión de una amplia gama de genes y ncRNAs neuronales importantes para la plasticidad sináptica y la remodelación estructural, incluyendo proteínas de las vesículas sinápticas, neuroreceptores y canales, así como

miRNAs que regulan a su vez redes de genes no neuronales (Ballas and Mandel, 2005; Ooi and Wood, 2007; Qureshi and Mehler, 2009; Roopra et al., 2001).

A



B

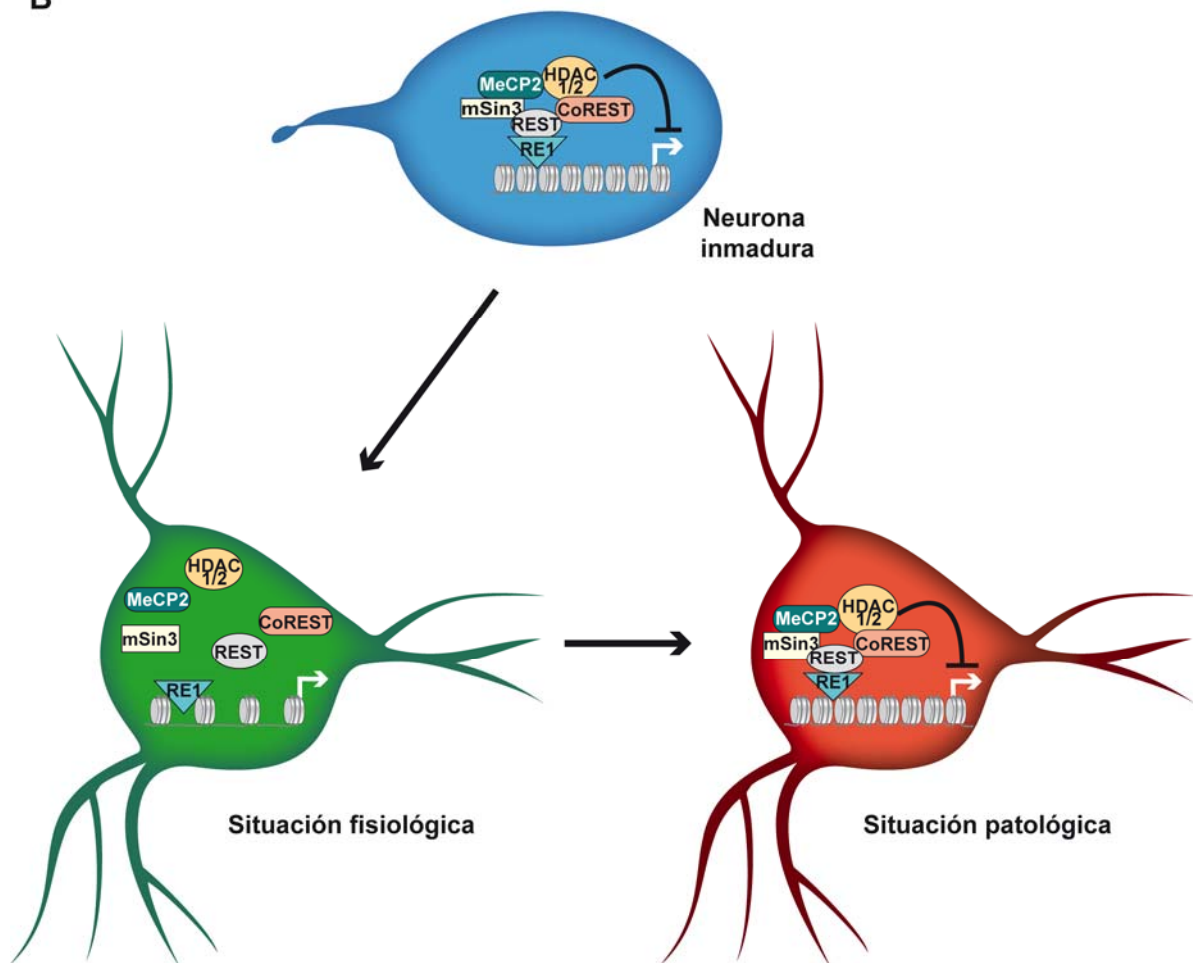


Figura 9. Esquema de la estructura, interacciones y función de la proteína REST. **A)** El esquema muestra de forma simplificada los dominios de represión RD1 y RD2 de los extremos N- y C-terminales, dominios ricos en lisina (aminoácidos 400 a 603) o prolina (aminoácidos 595 a 815), un dominio de unión a DNA compuesto por ocho dedos de zinc (rectángulos blancos), dos NLSs (rectángulos rojos), una zona de fosforilación en múltiples residuos próxima a RD2 y un último dedo de zinc en el extremo C-terminal. Esta proteína puede reclutar una gran variedad de co-represores transcripcionales a través de su interacción con los dominios RD1 y RD2; como ejemplos se muestran Sin3A, Sin3B y CoREST, que a su vez son capaces de reclutar otras proteínas como HDAC 1 y 2, entre otras. **B)** Remodelación de la cromatina en los genes neuronales a través de los complejos formados por REST en distintas situaciones. El represor REST, a través de el reclutamiento de diversos co-represores, es capaz de inhibir genes neuronales en células progenitoras y células no-neuronales diferenciadas (célula en color azul), manteniendo la cromatina en un estado compacto. En neuronas maduras en condiciones fisiológicas (neurona en color verde), los co-represores se disocian de REST y este a su vez de los elementos RE1, aunque se mantienen en el núcleo. La cromatina pasaría a estar en un estado más relajado y la transcripción de genes neuronales activa. En una situación patológica (neurona color rojo), REST es capaz de unirse a los motivos RE1 de los promotores de genes neuronales y reclutar distintos co-represores formando un complejo que reprime la transcripción de genes neuronales. *Adaptada de:* (Ballas and Mandel, 2005).

Sin embargo, actualmente, se considera que REST tiene un papel regulador clave sobre multitud de vías en distintos tipos celulares, y es una proteína moduladora clave del epigenoma celular. Este corepresor actúa como una plataforma para la integridad, estabilidad y regulación del genoma, y establece la represión o activación génicas en función del contexto celular.

Como se mencionó, entre los canales iónicos regulados por REST esta la subunidad GluN1 del NMDAR, existiendo una relación inversa entre los niveles de la subunidad y los de REST, que disminuyen progresivamente durante el desarrollo embrionario perdiéndose su interacción con un elemento RE1 (-150/-130) del promotor de *glun1* (Bai et al., 2003). Muy recientemente también se ha demostrado la participación de REST en el cambio que tiene lugar durante el desarrollo posnatal temprano en la composición del NMDAR, desde receptores formados fundamentalmente por subunidades GluN2B a GluN2A. Para ello es crítica la activación de REST en esa ventana temporal, que reprime la transcripción del gen codificante para GluN2B a través de mecanismos epigenéticos, modificando las propiedades del NMDAR hasta su forma madura (Rodenas-Ruano et al., 2012).

Dado que REST contiene una secuencia RE1 en su promotor podría estar regulando su propia expresión. En este sentido, es muy interesante la existencia de pequeños ncRNAs de doble cadena conteniendo secuencias RE1 (dsNRSEs), capaces de interaccionar con los complejos REST y promover la des-represión de genes regulados por elementos RE1 (Kuwabara et al., 2005). Por tanto, existe una estrecha relación entre la función de REST y la expresión de estos ncRNA, que es particularmente importante en la determinación del destino celular en el SN. De hecho, muchas de las funciones establecidas para REST en distintos aspectos de la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica (Chen et al., 1998) son similares para miRNAs y ncRNA [revisado en (Ooi and Wood, 2008)]. Los ncRNAs parecen jugar un papel importante en la interacción de REST con secuencias RE1 no canónicas que contienen inserciones de longitud variable dentro de la secuencia canónica (Ooi and Wood, 2007; Otto et al., 2007). Entre ellos están miRNAs específicos del tipo celular que sólo se expresan en cerebro como miR-9, miR-124 y miR-128 [revisado en (Ooi and Wood, 2008)]. Resulta muy interesante el hecho de que existan un gran número de sitios RE1 en las proximidades de genes codificantes para miRNAs enriquecidos en el SN y cuya expresión está regulada por REST (Wu and Xie, 2006). Por otra parte, la expresión de REST podría ser a su vez diana de múltiples ncRNAs, como los miRNAs miR-9 o miR-124 (Packer et al., 2008; Wu and Xie, 2006). En conjunto, estos datos muestran la complejidad de los mecanismos de regulación negativa entre REST y ncRNAs.

La actividad de los complejos REST-CoREST, o los ncRNAs relacionados con ellos, están implicados en la fisiopatología molecular de varias enfermedades, entre las que destacan el cáncer, desórdenes del neurodesarrollo y enfermedades neurodegenerativas. En neuronas maduras la función de REST es quiescente, pero puede activarse en respuesta al daño en determinadas neuronas del hipocampo selectivamente vulnerables donde reprime genes neuronales como el receptor opioide μ (Formisano

et al., 2007) o la subunidad GluR2 de los AMPARs (Calderone et al., 2003; Formisano et al., 2007) (**Fig. 9B**). Esto ocurre, por ejemplo, como consecuencia de procesos de isquemia cerebral global (Calderone et al., 2003; Formisano et al., 2007) o convulsiones epilépticas (Palm et al., 1998). También se ha demostrado la participación de REST en la regulación negativa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 1 (NCX1) tanto en cultivos primarios neuronales de rata como en un modelo de isquemia cerebral, a través del reclutamiento de CoREST y HDAC2, y su unión al elemento RE1 que posee en su promotor (Formisano et al., 2012). Muy recientemente, se ha demostrado que la remodelación epigenética dependiente de REST es crítica para la muerte neuronal en isquemia cerebral, y que este represor se une y silencia el promotor del gen *glun1* (Noh et al., 2012). Por último, en el estriado de pacientes que sufren la enfermedad de Huntington también se produce una acumulación de REST en ciertas neuronas selectivamente vulnerables (Zuccato et al., 2003). En modelos animales de esta patología y muestras postmortem de pacientes afectados por la enfermedad, se ha demostrado que la huntingtina mutante mHtt reduce la transcripción de BDNF y otros muchos genes neuronales al aumentar la unión de REST a secuencias RE1 presentes en los promotores de sus genes diana (Zuccato et al., 2007). El hecho de que la atenuación de la unión de REST al promotor de BDNF permita recuperar los niveles de esta neurotrofina, sugiere que es posible reestablecer la transcripción de genes neuronales en la enfermedad de Huntington (Zuccato et al., 2007).

4.5. HDACs.

Como se mencionó anteriormente, las HDACs son un grupo de enzimas de modificación que retiran grupos acetilos de las lisinas de otras proteínas, histonas o no histonas, estableciendo un balance con la acción de otra familia de proteínas, las HATs (Annunziato and Hansen, 2000; de Ruijter et al., 2003). Las HDACs no actúan uniéndose directamente al DNA, sino que necesitan asociarse con otros factores reguladores negativos para cumplir su función (de Ruijter et al., 2003; Pazin and Kadonaga, 1997), como explicamos en apartados anteriores de esta introducción. La primera HDAC de mamíferos fue caracterizada en 1996 (Taunton et al., 1996) y desde entonces, estas proteínas han sido implicadas en muchos tipos de procesos, entre ellos la represión transcripcional (Knoepfler and Eisenman, 1999; Wolffe and Guschin, 2000), la respuesta al daño en el DNA (Chen et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998) y la diferenciación (Marks et al., 2000). Estas proteínas, como ya dijimos, no solo deacetilan histonas sino que tienen muchos otros sustratos entre los que destacan, además de los ya mencionados FTs CREB y MEF2 (Glozak et al., 2005), p53, Sp1 o E2F (Bouwman and Philipsen, 2002; Gu and Roeder, 1997; Marzio et al., 2000).

En humanos se han descrito 18 HDACs diferentes, siendo su mecanismo de catalisis dependiente de zinc o de NAD^+ . Se pueden clasificar en cuatro grupos o clases:

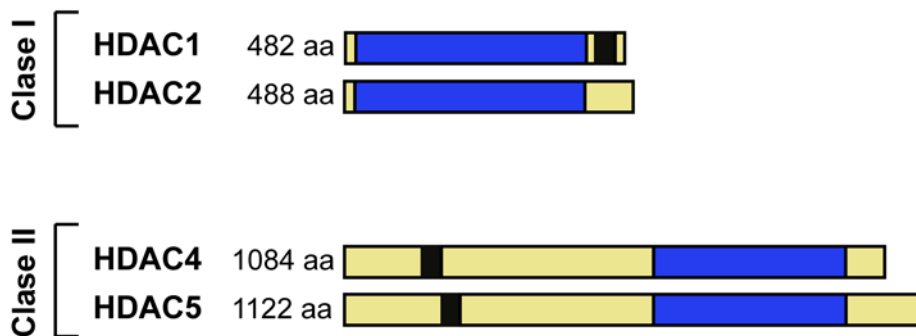
- Clase I: son enzimas dependientes de zinc y homólogas a la proteína RPD3 de levaduras. El grupo incluye las HDACs 1, 2, 3 y 8. Están compuestas por un dominio de dimerización N-terminal, un dominio central de actividad deacetilasa y un dominio C-terminal de regulación por fosforilación, acetilación, etc. Las más estudiadas y mejor conocidas son HDAC1 y HDAC2 (**Fig. 10A**).
- Clase II: también son dependientes de zinc y homólogas a la proteína de levaduras HDA1. A su vez se dividen en dos subclases: IIa (HDACs 4, 5, 7 y 9) (**Fig. 10A**) y IIb (HDACs 6 y 10).
- Clase III: son enzimas dependientes de NAD⁺ a las que se denomina sirtuinas, estando compuestas por 7 miembros, Sirt1-7 (Haigis and Guarente, 2006). Algunas de ellas también poseen actividad ADP-ribosiltransferasa (**Fig. 10B**).
- Clase IV: son enzimas dependientes de zinc y comparten características tanto de las HDACs de clase I como de clase II. A este grupo pertenece la HDAC 11 (Gao et al., 2002).

En diversas enfermedades neurológicas se ha encontrado un desbalance en los niveles de acetilación de proteínas y, consecuentemente, importantes alteraciones de la transcripción génica. Debido a ello, existe mucho interés en el desarrollo y caracterización de moléculas capaces de inhibir las funciones de las HDACs, que tienen un gran potencial como posibles fármacos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas e ictus, como veremos [revisado en (Chuang et al., 2009; Langley et al., 2009)]. Algunos de los inhibidores de las HDACs identificados están muy bien caracterizados y son selectivos para uno o varios miembros de la familia. Así por ejemplo, compuestos como la tricostatina A (TSA) o el ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA), también conocido como vorinostat) inhiben tanto a las HDACs de clase I como de clase IIa y IIb, y su mecanismo de acción está mediado por la unión al ión de zinc del sitio activo y la eliminación de la actividad deacetilasa (Finnin et al., 1999). También se han identificado, ácidos grasos de cadena corta, entre los que destacan el butirato y el ácido valproico (VPA), que inhiben a las HDACs de clase I y IIa. Otro tipo de inhibidores son las benzamidas, entre las que destaca el compuesto MS-275 (entinostatato), que inhibe preferentemente a la HDAC1 comparado con las HDAC3 y 8, y tiene muy poco efecto o ninguno sobre las HDAC4, 6, 7 y 9. Por último cabe destacar la nicotinamida, inhibidor exclusivo de las sirtuinas.

En general, los inhibidores de HDACs tienen efectos neuroprotectores, neurotróficos y propiedades anti-inflamatorias, y su uso en modelos animales de patologías neurodegenerativas mejora el rendimiento neurológico, además del aprendizaje, la memoria y la plasticidad sináptica [revisado en (Levenson and Sweatt, 2005)]. Los procesos de plasticidad sináptica y almacenamiento de memoria requieren la transcripción génica, donde es muy importante el papel desempeñado por

CREB y el reclutamiento de CBP. Por ello no es de extrañar que la mutación y pérdida de la actividad HAT de CBP sea un agente causal del síndrome de Rubinstein-Taybi, una alteración del desarrollo caracterizada por retraso mental (Bartsch et al., 2005). Anteriormente se pensaba que la inhibición de la actividad de las HDACs mejoraba la LTP y la memoria simplemente por facilitar la acetilación de histonas en los promotores de los genes CREB-CBP-dependientes. Sin embargo, estos inhibidores tienen mecanismos adicionales mediados a través del dominio de unión a CREB de CBP (Vecsey et al., 2007). Además, la inhibición de la deacetilación de otras proteínas no histonas como NF κ B también contribuye a mejorar la plasticidad sináptica (Yeh et al., 2004).

A



B

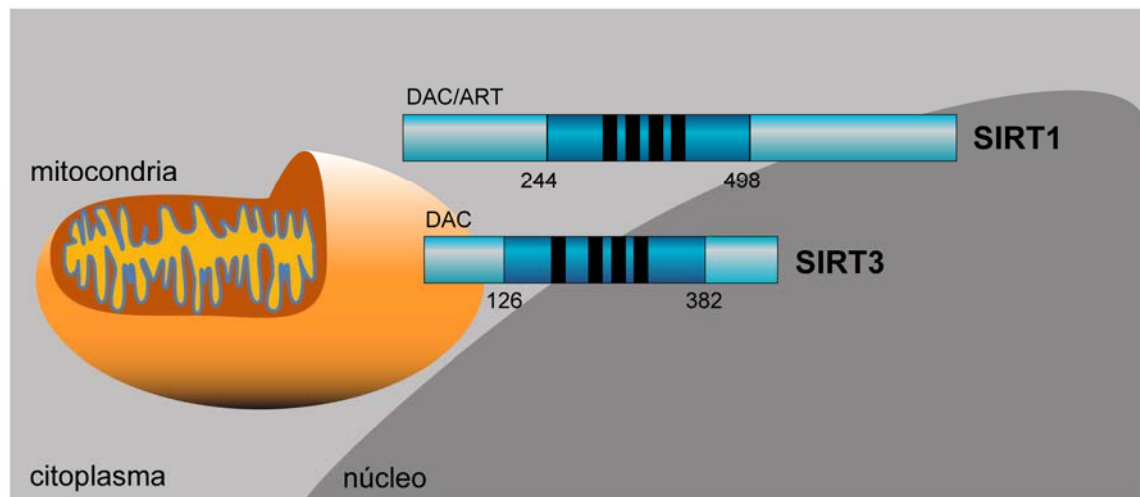


Figura 10. Esquema de la estructura de diferentes isoformas de HDACs. A) El esquema muestra de forma simplificada algunas HDACs de clases I (HDAC1 y 2) y II (HDAC4 y 5). Las barras representan los distintos tamaños de las proteínas y sus dominios catalíticos (azul) y motivos NLS (negro). *Adaptada de:* (de Ruijter et al., 2003). **B)** Representación esquemática de dos de las principales sirtuinas (HDACs de clase III). Las sirtuinas son proteínas desacetilasas dependientes de NAD⁺ (DAC) y, algunas de ellas, poseen también actividad ADP-ribosiltransferasa (ART). Se indican los dominios necesarios para las actividades DAC o ART (azul oscuro) y los motivos de unión a zinc (negro). En el esquema se representan la diferente localización subcelular de estas proteínas: nucleocitoplásmica para SIRT1 y principalmente mitocondrial para SIRT3, *Adaptada de:* (Karagiannis and Ververis, 2012).

Se han realizado numerosos estudios empleando inhibidores de HDACs *in vivo*, habiéndose demostrado por ejemplo que son capaces de proteger a las neuronas frente al daño isquémico en

modelos de isquemia transitoria o permanente. Así por ejemplo, la administración subcutánea del inhibidor VPA en modelos de isquemia transitoria, inmediatamente después de su inducción y repetida cada 12 h, reduce significativamente el volumen del infarto (Ren et al., 2004). Resultados similares se obtuvieron en experimentos con SAHA aunque no se pudo demostrar una dependencia del tamaño del infarto con la dosis de inhibidor utilizada (Faraco et al., 2006). También se ha comprobado la eficacia del TSA en dos modelos diferentes de MCAO transitoria en ratón, administrado respectivamente en la cavidad intracerebroventricular o por vía intraperitoneal previamente a la inducción del daño isquémico (Endres et al., 2000; Yildirim et al., 2008). La eficacia de estos inhibidores también ha sido probada en modelos de MCAO permanente. A pesar de la gravedad de la patología cerebral, la inyección subcutánea de VPA, butirato y TSA, inmediatamente o 12 h después de la oclusión, redujo eficazmente el tamaño del infarto cerebral y el daño neurológico (Kim et al., 2007). Sin embargo, hasta ahora, estos fármacos neuroprotectores no han sido eficaces en ensayos clínicos. En parte, estos resultados negativos podrían deberse a que los ensayos convencionales en modelos de isquemia usan animales jóvenes y sanos, mientras que pacientes con infarto cerebral son típicamente ancianos, que además suelen presentar otros tipos de enfermedades como obesidad o aterosclerosis (Wahlgren and Ahmed, 2004). Estas cuestiones tan críticas deberán ser abordadas mediante estudios adicionales en los que se ensayará la eficacia de estos inhibidores en animales de edad avanzada, con o sin las condiciones comórbidas antes mencionadas.

Como hemos mencionado, las modificaciones de la cromatina, especialmente su acetilación, están implicadas en la formación de la memoria y, por ello, el tratamiento con los inhibidores de HDACs incrementa la acetilación y facilita la formación de la memoria y el aprendizaje en ratones salvajes y en modelos de trastornos neurodegenerativos. Se está trabajando para tratar de establecer cuales son las HDACs concretas responsables de estos procesos. Los datos muestran que la sobre-expresión de HDAC2, pero no la de HDAC1, disminuye la densidad de las espinas dendríticas, el número de sinapsis, la plasticidad sináptica y la formación de memoria (Guan et al., 2009). Además, HDAC2 aparece asociada con las regiones promotoras de genes implicados en plasticidad y memoria. Por el contrario, la delección del gen *hdac2* produce un aumento del número de sinapsis y facilita la formación de la memoria de forma similar al tratamiento crónico con los inhibidores de HDACs. De cara a posibles terapias, es muy sugerente el hecho de que el tratamiento crónico con los inhibidores también es capaz de mejorar el número de sinapsis y el deterioro del aprendizaje en los animales que sobre-expresan HDAC2. Estos resultados en su conjunto demuestran que HDAC2 funciona como un supresor de memoria y del aprendizaje (Guan et al., 2009). Muy recientemente, el grupo de la Dra. Tsai ha demostrado que los niveles de HDAC2 aumentan en modelos de la enfermedad de Alzheimer y en pacientes de esta enfermedad, y que esta proteína se asocia e inhibe

la acetilación de histonas en genes importantes para el aprendizaje y la memoria (Graff et al., 2012). Es muy importante que el bloqueo epigenético de la transcripción ejercido por HDAC2 y el consecuente decline cognitivo son potencialmente reversibles, como muestran los experimentos de interferencia génica realizados para HDAC2. Por tanto, se ha propuesto que en los procesos neurodegenerativos las capacidades cognitivas quizá no estén completamente perdidas, sino sólo impedidas por un bloqueo epigenético, y que serían potencialmente recuperables mediante inhibidores específicos de HDAC2 (Graff et al., 2012).

Trabajos recientes también han demostrado un papel muy importante en la formación de la memoria, el aprendizaje y la plasticidad sináptica de la HDAC de clase III SIRT1. Ratones KO para *sirt1* presentan defectos en la plasticidad sináptica, aunque no tienen alteraciones en la transmisión sináptica basal o la función del NMDAR (Michan et al., 2010). Los cerebros de estos ratones mostraron una morfología y estructura de las espinas dendríticas normales, pero una disminución de la ramificación, la longitud y la complejidad de los árboles dendríticos. Por el contrario, los ratones con niveles altos de SIRT1 en el cerebro muestran una plasticidad sináptica y memoria normales (Michan et al., 2010). Posteriormente se ha demostrado que SIRT1 modula la plasticidad sináptica y la formación de la memoria a través de un mecanismo mediado por un miRNAs específico de cerebro, miR-134, que regula la expresión de CREB (Gao et al., 2010). La deacetilasa SIRT1 normalmente limita la expresión de miR-134 a través de un complejo represor en el que participa el FT YY1 (*Yin Yang 1*) sin embargo, en ausencia de SIRT1 aumentan los niveles de miR-134 y se produce la disminución de la expresión de CREB y BDNF, afectando de esta manera a la plasticidad sináptica (Gao et al., 2010). Estos datos implican que SIRT1 actúa de forma directa regulando la función normal del cerebro por un mecanismo independiente de sus acciones sobre la supervivencia neuronal.

Las sirtuinas son proteínas reguladoras de los sistemas de defensa celular, que integran el control metabólico y la regulación de la transcripción. Estas enzimas consumen NAD^+ metabólico para catalizar la deacetilación de ciertos residuos en determinados FTs como Foxo3a (Jiang et al., 2012) o el co-activador de CREB, TORC1 (Jeong et al., 2012), lo que conduce a su activación y la inducción de la expresión de BDNF y otros genes diana neuroprotectores. Como producto de la reacción de deacetilación, las sirtuinas generan 2'-O-Acetil-ADP-ribosa y nicotinamida. Por ello, la nicotinamida es un potente inhibidor biológico de estas enzimas, que previene la pérdida de NAD^+ que tiene lugar en procesos caracterizados por un profundo estrés bioenergético [revisado en (Yang and Sauve, 2006)]. Sin embargo, la nicotinamida también es un precursor del NAD^+ y tiene un efecto neuroprotector mediado por la activación de las sirtuinas. Por ejemplo, se ha demostrado que este compuesto previene la depleción de NAD^+ que tiene lugar en procesos caracterizados por un profundo estrés bioenergético, como son la excitotoxicidad y la isquemia, protegiendo a las neuronas de la muerte (Liu et al., 2009). La nicotinamida también reduce el daño cerebral causado en ratas jóvenes

mediante un modelo de isquemia por hipoxia, a través de la reducción del estrés oxidativo y la actividad de caspasa-3 (Feng et al., 2006). Recientemente, se han publicado dos trabajos que demuestran un efecto neuroprotector de SIRT1 en la enfermedad de Huntington (Jeong et al., 2012; Jiang et al., 2012). En ambos trabajos se ha caracterizado la interferencia de la actividad deacetilasa de SIRT1 mediada por su interacción con la proteína mHtt como un mecanismo patológico en esta enfermedad. Dicha interacción prevendría la activación por SIRT1 de sus proteínas diana y la disminución de la expresión de determinados factores neuroprotectores y neurotróficos, provocando la neurodegeneración propia de la enfermedad. Como mencionamos anteriormente, el efecto neuroprotector de SIRT1 está mediado por la deacetilación y activación de TORC1, que promueve su desfosforilación e interacción con CREB (Jeong et al., 2012). Por otra parte, la sobre-expresión de SIRT1 favorece la fosforilación y activación de TrkB y la deacetilación de Foxo3a, facilitando la supervivencia neuronal (Jiang et al., 2012). También se ha relacionado a SIRT1 con la deacetilación de MEF2 durante la diferenciación de células musculares (Zhao et al., 2005).

Existen otras sirtuinas implicadas en procesos de neuroprotección frente al daño por excitotoxicidad, como es el caso de la sirtuina mitocondrial SIRT3 (**Fig. 10B**). Los niveles de esta deacetilasa aumentan como consecuencia del incremento en la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) producido en respuesta a la depleción del NAD^+ citosólico. La enzima SIRT3 mitocondrial actúa como un factor de supervivencia neuronal y juega un papel esencial protegiendo a las neuronas del daño excitotóxico (Kim et al., 2011).

OBJETIVOS

Dentro de un proyecto dirigido a estudiar los mecanismos de la muerte neuronal inducida por la excitotoxicidad y la isquemia cerebral, el objetivo general de este trabajo ha sido analizar los mecanismos transcripcionales de regulación de la expresión de la subunidad GluN1 del NMDAR, componente obligatorio del mismo y necesario para su función.

Para lograr alcanzar este objetivo general, podemos plantear los siguientes objetivos específicos:

- Identificar los elementos de respuesta CRE y MEF2 necesarios para la regulación del promotor del gen *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad y análisis de sus posibles sinergias.
- Determinar la posible participación de la quinasa ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad a través de la activación de FTs de la familia MEF2.
- Caracterizar la regulación de la actividad de ERK5 y de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D por mecanismos de fosforilación/defosforilación y proteólisis en condiciones basales y de excitotoxicidad, analizando sus efectos sobre la expresión de GluN1.
- Estudiar la participación del represor transcripcional REST en la regulación de *glun1* identificando los elementos de respuesta necesarios para dicha regulación.
- Analizar un posible mecanismo de regulación epigenética de la expresión de GluN1 a través de HDACs en condiciones basales y de excitotoxicidad.
- Estudio de la regulación de GluN1 y de las proteínas implicadas en su control transcripcional en un modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos.

Los reactivos utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Ascent Scientific (North Somerset, Reino Unido):
El co-agonista del NMDAR glicina.
- Calbiochem (Darmstadt, Alemania):
Los inhibidores de calpaína, carbobenzoxi-valinilfenilalanina (inhibidor III de calpaína, aquí denominado CIII) y benciloxycarbonil-leucil-norleucina (calpeptina).
- Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU):
Los medios de cultivo *Minimum Essential Medium* (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *OPTI-MEM*, *Iscove's Modified Dulbecco Medium* (IMDM), medio Neurobasal, el suero fetal bovino (FBS), los sueros de caballo (HS) y cabra, la *Lipofectamina 2000*, los antibióticos penicilina y estreptomicina, el análogo de la glutamina *Glutamax*.
- Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA, EEUU):
El reactivo de bioluminiscencia *ECL Western Lighting Chemiluminisence Reagent Plus* utilizado para la detección de los inmunocomplejos.
- Pierce (Rockford, IL, EEUU):
El reactivo BCA para la cuantificación de proteína.
- Promega Corporation (Madison, WI, EEUU)
El kit Dual-Luciferase Reporter Assay System.
- Regeneron Pharmaceuticals (Tarrytown, NY, EEUU)
El BDNF, cedido amablemente por el Dr. J.M. Cosgaya (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid).
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU)
RNAs interferentes para HDAC1 (HDAC1 siRNA), para REST/NRSF (NRSF siRNA) y un control (Control siRNA-B).

Materiales y métodos

- Selleck Chemicals (Houston, TX, EEUU)

El inhibidor de la vía MEK5-ERK5, BIX02188 y el inhibidor específico de HDAC1, MS-275.

- SIGMA (St. Louis, MO, EEUU):

Los compuestos bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), citosina β-D-arabino-furanósido (AraC), cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), poli-L-lisina, L-laminina, los inhibidores de proteasas, diferentes oligonucleótidos utilizados para mutagénesis y secuenciación, proteína A-sefarosa, el inhibidor de HDACs de clase I y II trichostatina A, SAHA y butirato de sodio, y el inhibidor de sirtuinas nicotinamida.

- Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido):

El co-agonista del NMDAR N-metil-D-aspartato (NMDA) y el inhibidor de fosfatasa ácido okadaico (AO).

2. Tampones y soluciones.

- Phosphate Buffered Saline (PBS): NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM (pH 7'4).
- Tris Buffered Saline (TBS): Tris-Cl 20 mM (pH 7'5), NaCl 137 mM.
- TBS-Tween (TBS-T): TBS, Tween-20 0'05%.
- Solución de bloqueo: leche de vaca desnatada en polvo 5% preparada en TBS-T.
- Tampón de electroforesis: Tris-Cl 25 mM (pH 8'3), glicina 250 mM, SDS 0'1%.
- Tampón de carga de electroforesis: Tris-Cl 50 mM (pH 6'8), ditioneitol (DTT) 100 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) 2%, azul de bromofenol 0'005%, glicerol 10%.
- Tampón de transferencia: Tris-Cl 25 mM, glicina 250 mM (pH 8,3), metanol 10%.
- Tampón de lisis RIPA: Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7'2), NaCl 150 mM, deoxicolato sódico 1%, NP-40 1%, SDS 0'1%.

3. Anticuerpos.

- Para la detección de GluN1 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (ref. 556308, Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) generado contra un epítipo de la región extracelular de la proteína, aa 660-811. La dilución empleada fue de 1:1000 en ensayos de *immunoblot* (IB) y 1:250 en inmunofluorescencia (IF).

- Para la detección de CREB se usó un anticuerpo monoclonal de conejo (ref. 9197, Cell Signaling Technology, Inc., Trask Lane Danvers, MA, EEUU) generado contra una región amino terminal de la proteína CREB humana. La dilución utilizada fue de 1:1000 en IB, 1:250 en IP y 1:250 en ChIP.
- La forma activa de CREB fosforilada en la Ser133, la detectamos con un anticuerpo policlonal de conejo (ref. 06-519, Millipore Corporation, Billerica, MA, EEUU). La dilución utilizada en IB fue de 1:1000, en IP 1:100 y en ChIP 1:100.
- La isoforma A de MEF2 la detectamos con un anticuerpo policlonal de conejo (MEF2A, ref. 32866, Abcam, Cambridge, UK) que reconoce los aa 272-491 de la proteína humana MEF2A. La dilución usada en IB fue de 1:1000.
- Para analizar MEF2D un anticuerpo monoclonal de ratón (ref. 610774, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, EEUU) a una dilución de 1:2500 en IB.
- La HDAC1 se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo (ref. 7028, Abcam, Cambridge, UK) que reconoce los aa 466-482 de la proteína humana. La dilución de uso en IB fue de 1:1000 y en IF de 1:250.
- Para detectar todas las forma de ERK5 se empleó un anticuerpo policlonal de conejo (ref. 3372, Cell Signaling Technology, Inc., Trask Lane Danvers, MA, EEUU). La dilución en IB fue de 1:1000.
- Para la detección de la forma fosforilada y activa de ERK5 usamos un anticuerpo específico para sus Tyr218 y Thr220 fosforiladas (ref. 3371, Cell Signaling Technology, Inc., Trask Lane Danvers, MA, EEUU). La dilución en IB fue de 1:250.
- La espectrina cerebral y los fragmentos generados por su proteólisis fueron analizados con un anticuerpo monoclonal (ref. MAB1622, Chemicon, Temecula, CA, EEUU) a una dilución de 1:5000 para IB.
- Otros anticuerpos monoclonales reconocen a la proteína nuclear neuronal (NeuN, ref. ab13938, Abcam, Cambridge, Reino Unido), utilizado a diluciones 1:100 (IF) y 1:1000 (IB), β III-tubulina (ref. MAB1637, Chemicon, Temecula, CA, EEUU) a 1:5000 en IB, la proteína verde fluorescente (GFP) (ref. 11814460, Roche, Indianapolis, IN, EEUU) a 1:5000 en IB.
- También se utilizaron otros anticuerpos policlonales de conejo como los que reconocen a la enolasa neuronal específica (NSE, ref. AB951, Chemicon, Temecula, CA, EEUU), utilizado a dilución 1:10000 en IB, MEF2 (ref. sc-313, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), que reconoce a todas las isoformas del FT pero principalmente a la A, empleado a 1:1000 en IB, TrkB (anti-panTrkB, ref. sc-8316, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) a una dilución de 1:500 en IB, la forma activa de TrkB fosforilada en su residuo Tyr515 (p-Trk, este anticuerpo

también podría reconocer receptores TrkA fosforilados en Tyr490, ref. 9141, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EEUU) a una dilución de 1:500 en IB, los residuos 801-1097 de la forma humana del represor REST (ref. 07-579, Millipore Corporation, Billerica, MA, EEUU) a una dilución de 1:1000 en IB.

- En los experimentos de *immunoblot* se utilizaron anticuerpos secundarios policlonales generados en cabra o burro acoplados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) a una dilución de 1:5000.
- Finalmente, en los experimentos de inmunofluorescencia se usaron los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU).

4. Cultivos celulares.

4.1. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se obtuvieron a partir de embriones de rata *Wistar* de día E18 según el protocolo descrito previamente (Rose et al., 1993), con algunas modificaciones. Las placas fueron pretratadas con poli-L-lisina (100 µg/ml) y laminina (4 µg/ml) durante una noche a 37°C antes de su utilización. Las cortezas cerebrales fueron diseccionadas y homogenizadas mecánicamente en medio de cultivo MEM suplementado con NaHCO₃ 28'5 mM, glucosa 22'2 mM, glutamax 0'1 mM, FBS 5%, HS 5%, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células se sembraron a alta densidad ($0,3 \times 10^6$ células/cm²) en el mismo medio y se mantuvieron en una atmósfera a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para inhibir el crecimiento de las células gliales se añadió al medio de cultivo el agente intercalante del DNA citosina-β-D-arabino-furanósido (AraC, 10 µM) a los 7 días *in vitro* (DIVs), excepto en el caso en que se fuesen a realizar experimentos de transfección. A continuación, los cultivos se mantuvieron hasta completar un total de 11 DIVs, en el caso de experimentos que requerían transfección, o 14 DIVs, para el resto de los experimentos. En ambos casos, los cultivos presentaban un alto grado de maduración y diferenciación, con dendritas y axones que forman una densa red que recubre toda la placa de cultivo (Rose et al., 1993). Finalmente, las células se trataron a los tiempos indicados con las siguientes concentraciones de reactivos: NMDA 100 µM (salvo en los ensayos de dosis-respuesta), glicina 10 µM, Cilll 10 µM, lactacistina 20 µM, calpeptina 10 µM, BIX02188 10 µM, AO 2 nM y 1 µM, BDNF 50 ng/ml, TSA 1 µM, butirato 0'5 µM, SAHA 2 µM, MS-275 (1, 3, 5, 10, 40 y 80 µM, según se indica) y nicotinamida (NAM) 10 mM.

4.2. Cultivo de células HEK293T.

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T fue cultivada en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), y mantenida a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para la generación de lentivirus, una vez retirada la mezcla de DNA y liposomas, el medio de cultivo fue sustituido por IMDM, una modificación del DMEM muy apropiada para el crecimiento de cultivos de alta densidad como los utilizados en la producción de lentivirus.

4.3. Cultivo de células PC12.

La línea celular PC12 derivada de feocromocitoma de rata se sembró sobre placas recubiertas con colágeno de rata diluido al 30% en etanol, y se mantuvo en medio de cultivo DMEM suplementado con 7'5% de FBS, 7,5% de HS, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), en un ambiente a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

5. Modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis.

El modelo de isquemia por fototrombosis se realizó gracias a la colaboración del equipo de trabajo dirigido por el doctor J.M. Roda del Hospital Universitario La Paz. El método consiste en la inducción fotoquímica de una trombosis intravascular por administración intraperitoneal (10 mg/kg) de un compuesto de contraste fotosensible (Rosa de Bengala). Seguidamente, la técnica conlleva la irradiación con luz fría (600 lms, 3000 K) de la área cortical escogida, a través de la superficie pial y el cráneo. El Rosa Bengala es un fotosensibilizante muy potente que induce un daño endotelial y la formación de plaquetas, produciendo una trombosis y coagulación microvascular masiva en el tejido expuesto (Schroeter et al., 2002). De esta forma se imita la oclusión vascular y la formación de agregados plaquetarios producida durante la isquemia cerebral. La isquemia por fototrombosis es un modelo de isquemia permanente que tiene la ventaja de ser menos invasivo y más sencillo de abordar que otras técnicas por oclusión de la arteria cerebral media (ACM).

Se utilizaron ratones machos adultos Swiss (Harlan) con un ámbito de peso de 35-40 g, que fueron anestesiados con isofluorano mediante mascarilla facial. Durante todo el proceso experimental se controló la temperatura corporal. El haz de luz se hizo incidir en el hemisferio derecho a 3 mm a la derecha y 2 mm posterior a Bregma por un período de 30 min (hemisferio ipsilateral, I), utilizándose como control las regiones equivalentes del hemisferio contralateral (C). Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos (0, 2,5, 24 y 72 h) tras la inducción del daño; los

Materiales y métodos

cerebros se congelaron a -20°C por 20 min y luego se cortaron en rodajas coronales de 1 mm de grosor. Para el análisis por *immunoblot* se extrajeron las zonas ipsilateral infartada y la región equivalente contralateral y se prepararon extractos proteicos según se indica. Para comprobar la aparición del infarto, las rodajas de cerebro se tiñeron con una solución al 2% de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Merck Bioscience, Darmstadt, Alemania).

6. Plásmidos y vectores lentivirales (para algunos de ellos se muestran entre paréntesis sus nombres originales).

- **pGluN1 (pNRL 5'4 Kb):** plásmido cedido amablemente por el doctor Dr. Bai (Universidad de Maryland, USA) que contiene una región promotora de 5'4Kb del gen *glun1* de rata insertada en el plásmido pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA), controlando la expresión del gen que codifica para la luciferasa de la luciérnaga (Bai et al., 2003). A partir de esta secuencia del promotor de *glun1*, en esta tesis se han generado una serie de mutantes de delección para sitios MEF2 y CRE.
- **pGluN1 ΔMEF (-812/-789):** plásmido generado a partir de pGluN1 mediante delección de los nucleótidos TTTAGCTAGCGATAG, generando una secuencia para la enzima de restricción HpaI (**GTTAAC**), empleando para ello los oligonucleótidos: S-5'-CCCCCAATTTGGT**GTTAAC**AGACCCTG-3' y AS-5'-CAGGGTCT**GTTAAC**ACCAAATTGGGGGG-3'. Fue comprobado por secuenciación y digestión con la enzima HpaI.
- **pGluN1ΔMEF (-2363/-2341):** este plásmido fue generado a partir de pGluN1 mediante delección de los nucleótidos TTCTCTGCCCTATCTTTACTTCAAAACGTGTGGTAA, generando una secuencia para la enzima de restricción BamHI (**GGATCC**), empleando para ello los oligonucleótidos: S-5'-GACCTAGAGACT**GGATCC**ATAAGCTTGACAC-3' y AS-5'-GTGTCAAGCTTAT**GGATCC**AGTCTCTAGGTC-3'. Fue comprobado por secuenciación y digestión con la enzima BamHI.
- **pGluN1ΔMEF:** este plásmido fue generado a partir de pGluN1ΔMEF (-812/-789) mediante delección de los nucleótidos TTCTCTGCCCTATCTTTACTTCAAAACGTGTGGTAA, generando una secuencia para la enzima de restricción BamHI (**GGATCC**), empleando para ello los oligonucleótidos: S-5'-GACCTAGAGACT**GGATCC**ATAAGCTTGACAC-3' y AS-5'-GTGTCAAGCTTAT**GGATCC**AGTCTCTAGGTC-3'. Fue comprobado por secuenciación y digestión con la enzima BamHI.

- **pGluN1 Δ CRE:** este plásmido se ha generado a partir de pGluN1 mediante delección de los nucleótidos CGCGCGTCAGGAGGCGCGCACTCGACTCAGCGTCAGGAAG, generando una secuencia para la enzima de restricción BamHI (**GGATCC**), empleando para ello los oligonucleótidos: S-5'-CCGAGCATTACGCCAACGCAG**GGATCC**GGGGGCGGTGGGAGGGG-3' y AS-5'-CCCCTCCCACCGCCCC**GGATCCT**GCGTTGGCGTGAATGCTCGG-3'. Fue comprobado por secuenciación y digestión con la enzima BamHI.
- **pGluN1 Δ CRE Δ MEF:** plásmido generado a partir de pGluN1 Δ MEF mediante delección de los nucleótidos CGCGCGTCAGGAGGCGCGCACTCGACTCAGCGTCAGGAAG, generando una secuencia para la enzima de restricción BamHI (**GGATCC**), empleando para ello los oligonucleótidos: S-5'-CCGAGCATTACGCCAACGCAG**GGATCC**GGGGGCGGTGGGAGGGG-3' y AS-5'-CCCCTCCCACCGCCCC**GGATCCT**GCGTTGGCGTGAATGCTCGG-3'. Fue comprobado por secuenciación y digestión con la enzima BamHI.
- **pGluN1 Δ RE1 (pNRL 5'4 Δ RE1):** plásmido cedido amablemente por el doctor Dr. Bai (Universidad de Maryland, USA) que fue generado a partir de pGluN1 mediante mutagénesis de los nucleótidos TTCAGCACCTCGGACAG y, por tanto presenta una delección del elemento RE1 presente en posición -150/-131 (Bai and Kusiak, 1997; Bai et al., 2003).
- **pMEF (pRSRF):** plásmido cedido por el laboratorio del Dr. Winoto (Universidad de California, Berkeley, California). Contiene el gen de la luciferasa insertado en pGL2-*basic* (Promega, Madison, USA) bajo el control de un fragmento de la región promotora del gen Nur77 (-307/-242) que incluye dos sitios RSRF (MEF2) de secuencia conocida (CTATATTTAG y CTATTATAG) (Woronicz et al., 1995).
- **pmMEF (pRSRFmut):** plásmido generado a partir de pMEFcons introduciendo mutaciones en los elementos RSRF para bloquear su activación por MEF2 (CGATATTT**CG** y CGATTAT**CG**, cambios en rojo) (Woronicz et al., 1995), cedido igualmente por el Dr. Winoto.
- **pCRE:** cedido por la Dra. Rodriguez-Peña (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España). Fue obtenido a partir del vector pTK-Luc (Promega, Madison, USA) en el que se inserto delante del gen de la luciferasa un oligonucleótido (25 bases) que contiene los dos elementos CRE del promotor de TrkB (Deogracias et al., 2004).
- **pTRKB (pACC o -1600trkB-P2-Luc):** contiene el fragmento -1606 a -325 de la región promotora de *ntrk2* (el gen de TrkB), subclonado en el vector pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) controlando la expresión de la luciferasa (Deogracias et al., 2004). El gen *ntrk2* se transcribe

Materiales y métodos

desde dos promotores, siendo los sitios de iniciación de la transcripción -1800 para el promotor 1 (P1) y -448 para el 2 (P2) (Barettino et al., 1999). Este plásmido contiene el promotor P2 y los dos elementos CRE presentes entre P1 y P2.

- **pTRKB mut (pACC del o -1600ΔCREtrkB-P2-Luc):** plásmido generado a partir de pTRKB mediante la delección de los sitios CRE (CTGCGTCAGcccTCACGTCA) (Deogracias et al., 2004), cedido junto con pTRKB por la Dra. Rodríguez-Peña.
- **pBDNF (pIII BDNF):** plásmido generado en el laboratorio del Dr. Greenberg (*Children's Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*). Contiene un fragmento de 170 pb del promotor III del gen *bdnf* de rata clonado en el vector pGL3-Promega, Madison, USA) regulando la expresión de luciferasa (Tao et al., 1998).
- **pRL-null (pRL-null-Renilla):** vector reportero utilizado como control interno en las co-transfecciones con los vectores de luciferasa. Carece de elementos promotores y *enhancers* y controla de forma constitutiva la expresión de bajos niveles del gen de la luciferasa de la *Renilla* procedente de un organismo marino (Promega, Madison, USA).
- **pcDNA3:** vector diseñado por Invitrogen (Grand Island, NY, USA) para la expresión transitoria y eficiente de genes en células de mamíferos, en el que la expresión de los cDNAs esta regulada por un promotor del citomegalovirus (CMV) humano. Es utilizado como control interno en los experimentos de sobre-expresión de proteínas mediante transfección de sus correspondientes cDNA
- **cERK5:** contiene el cDNA de ERK5 aislado del timo de ratón clonado en el vector de expresión pcDNA3 (Kasler et al., 2000). Fue cedido por el laboratorio del Dr. Winoto (Universidad de California, Berkeley, California, USA).
- **cHDAC1:** contiene 1'45Kb del cDNA de HD1 (HDAC1) subclonado a partir del plásmido pBJS-HD1 (Taunton et al., 1996) en pcDNA3. Fue obtenido en el laboratorio del Dr. Kouzarides (Universidad de Cambridge, Cambridge, UK) y cedido amablemente a través de la Dra. Aurora Sánchez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España).
- **cREST (cDNA REST-FL):** plásmido que contiene el cDNA *full lenght* de REST (REST-FL) humano en el vector pcDNA3 y codifica para los aminoácidos 1 a 1098 (Plaisance et al., 2005). Fue cedido por el Dr. Abderrahmani (Universidad de Lausanne, Suiza).

- **cREST- Δ C (cDNA REST- Δ C-t):** plásmido generado a partir de cREST en el que se ha deletado la región codificante para el extremo C-terminal y expresa una proteína REST truncada (aminoácidos 1 a 417) (Plaisance et al., 2005).
- **cREST- Δ N (cDNA REST- Δ N-t):** plásmido generado a partir de cREST en el que se ha deletado la región codificante para el extremo N-terminal y expresa una proteína REST truncada (aminoácidos 212 a 1098) (Plaisance et al., 2005). Estos dos últimos vectores fueron igualmente cedidos por el Dr. Abderrahmani.
- **LV-DsRed-GFP:** vector lentiviral dual que dirige la expresión de las proteínas fluorescentes DsRed y GFP bajo el control de sendos promotores neuroespecíficos correspondientes al gen humano de la sinapsina I (Gascon et al., 2008). Tras la secuencia de cada uno de estos genes se encuentra una secuencia estabilizadora WPRE (*Woodchuck Hepatitis Virus Post-transcriptional Regulatory Element*), capaz de estimular la expresión de genes heterólogos.
- **LV-VP16-CREB-GFP:** vector lentiviral generado por la Dra. Celia López en el laboratorio de la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España) mediante la sustitución del gen de DsRed en LV-DsRed-GFP (Gascon et al., 2008) por la secuencia codificante para la proteína VP16-CREB, amablemente cedida por el Dr. A. Barco (Instituto de Neurociencias, Alicante). El vector LV-VP16-CREB-GFP dirige la co-expresión de GFP y una proteína de fusión VP16-CREB, que es una forma constitutivamente activa de este FT (Barco et al., 2002). En esta proteína, el primer dominio de transactivación de CREB ha sido reemplazado por el dominio de transactivación ácido del virus del Herpes simple (HSV) denominado VP16.

7. Generación y titulación de lentivirus.

La producción de los virus recombinantes se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente (Lois et al., 2002) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó una triple transfección en células HEK293T con el vector lentiviral y los plásmidos de empaquetamiento pCAG-VSVg (Matsuura et al., 2001) y pCMV Δ R8.91 (Zufferey et al., 1997), utilizando *Lipofectamina 2000* según las instrucciones del fabricante. Transcurridas 4 h, se procedió a la sustitución del medio de transfección por medio de cultivo IMDM que se mantuvo durante 48 h. Los sobrenadantes, conteniendo las partículas virales, fueron recogidos y filtrados mediante el uso de unidades de filtración Steriflip-HV (Millipore, Billerica, MA, EEUU) con poro de 0'45 μ m. A continuación, los virus fueron concentrados por ultracentrifugación en un rotor basculante SW28 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) a 20000 r.p.m. durante 2 h a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, el virus sedimentado fue

Materiales y métodos

resuspendido en PBS durante una noche a 4°C, tras lo cual, se repartió en alícuotas y conservó a -70°C.

La titulación de los lentivirus se realizó por FACScan siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio del Dr. D. Trono (Facultad de Medicina, Universidad de Ginebra CMU, Suiza) que está publicado en su página web (http://tronolab.epfl.ch/webdav/site/tronolab/shared/protocols/protocols_LVtitration.html), con algunas modificaciones. Se utilizó la línea celular PC12 ya que en ella se expresa el gen de sinapsina (Thiel et al., 1991) y, por tanto, también los transgenes bajo el control de su promotor presentes en los vectores lentivirales. Brevemente, 6×10^4 células fueron sembradas en pocillos de placas M-24 y, transcurridas 24 h, se determinó su número exacto y se procedió a su infección con diluciones seriadas de la suspensión viral. Setenta y dos horas después, se determinó el porcentaje de células que expresaban GFP mediante análisis por citometría de flujo con FACScan (B-9320, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A continuación, se procedió al cálculo del título lentiviral expresado en unidades de transducción (UTs) para un volumen determinado de suspensión viral según la fórmula: $P \times N/100 \times V$, donde P es el porcentaje de células verdes, N el número de células presentes en el momento de la transducción, y V el volumen de virus utilizado. Para realizar este cálculo, se escogieron los datos de la dilución de virus que presentaba un porcentaje de infección dentro del rango lineal (5-20%). En base a estos cálculos se estableció la multiplicidad de infección (MOI) de cada experimento (expresada como UT/célula), siendo 1 UT/célula o MOI=1 el volumen de suspensión viral necesario para transducir el 100% de las células en cultivo.

8. Infección de cultivos primarios con lentivirus.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se infectaron con los volúmenes de suspensión viral correspondiente a LV-DsRed-GFP o LV-VP16-CREB-GFP necesarios para tener la misma MOI. La infección se inició a los 10 DIVs y continuó durante 4 días. Los tratamientos con NMDA y glicina, se realizaron a los 14 DIVs.

9. Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo MTT.

El ensayo de la viabilidad celular en los cultivos de neuronas corticales se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) realizada por las enzimas mitocondriales de las células vivas. El compuesto anterior fue añadido directamente al medio de cultivo a una concentración de 0'5 mg/ml y, tras 2 h a 37°C, el medio fue sustituido por dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán resultantes de la reducción del MTT. A continuación, se cuantificaron los cristales formados mediante espectrometría

midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y sustrayendo el valor de fondo obtenido a 630 nm. Para establecer la contribución de las células gliales presentes en los cultivos mixtos a los valores de viabilidad celular total, cultivos paralelos fueron tratados con NMDA 400 μ M y glicina 10 μ M durante 24 h, y analizados mediante el mismo ensayo. En estas condiciones se consigue la muerte neuronal casi en su totalidad, mientras que las poblaciones no neuronales no se ven afectadas (Choi et al., 1988). La sustracción de este valor de absorbancia de cada uno de los datos obtenidos permitió establecer la viabilidad neuronal en las distintas condiciones analizadas. Todas las medidas de viabilidad fueron realizadas en triplicado.

10. Immunoblot.

La lisis de los cultivos primarios se realizó en tampón RIPA conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (*Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets* y *PhosSTOP Phosphatases Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Indianapolis, IN, EEUU) durante 30 min a 4°C, con agitación cada 15 min, y los restos celulares insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. Las muestras de cerebro de ratón se lisaron en el mismo tampón modificado para contener SDS 1% y DTT 1 mM, e idéntica combinación de inhibidores. La concentración de proteína se cuantificó con el reactivo BCA (Pierce). La separación electroforética de cantidades equivalentes de proteína se realizó en geles de poliacrilamida al 8%-15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según el método de Laemmli. Como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas preteñidas (BenchMark™). Seguidamente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatmann, 0'45 μ m) en forma sumergida a una intensidad de corriente de 400 mA (150 V) durante 1 h. Las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 1%, preparado en ácido acético al 1%, para verificar la eficiencia de la transferencia. Una vez eliminada la tinción, las membranas se lavaron con TBS-T y se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con solución de bloqueo (*PhosphoBlocker*, Cell Biolabs Inc. San Diego, CA, USA) que ayuda a preservar los antígenos de proteínas fosforiladas. La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante procedimientos estándares usando anticuerpos primarios y secundarios diluidos en solución de bloqueo como se indicó anteriormente. Los inmunocomplejos formados se detectaron mediante bioluminiscencia con el reactivo ECL (Perkin-Elmer Life Sciences). La cuantificación densitométrica de las bandas de proteína se realizó con el programa de análisis *ImageJ* (NIH). A continuación, los resultados fueron normalizados respecto a los obtenidos para el control de carga en cada caso usado en las mismas muestras y comparados con los de las células sin tratar, a los que arbitrariamente asignamos un valor del 100%.

Materiales y métodos

11. Fraccionamiento subcelular.

Cultivos primarios neuronales de 14 DIVs, tratados o no con NMDA 100 μ M y glicina 10 μ M durante 2 h, fueron lavados 2 veces con TNE (Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). Las células se rascaron y suspendieron en este mismo tampón, y se separó $\frac{1}{4}$ del volumen para preparar el lisado total (LT). Para ello, tras la sedimentación de las células a 1500 r.p.m. y 4°C durante 10 min, éstas fueron lisadas en 200 μ l de tampón NPBD (1% DOC, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1% SDS, 10 mM Tris/HCl pH 7.5) conteniendo como anteriormente inhibidores de fosfatas y proteasas y DTT 2 mM. Estos extractos se sonicaron 5 min y fueron centrifugados a 3000 r.p.m. y 4°C durante 10 min, correspondiendo el sobrenadante obtenido al LT. Las células restantes ($\frac{3}{4}$ del volumen inicial) fueron sedimentadas de igual manera y resuspendidas en 600 μ l de NPB (2 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10 mM Tris /HCl pH 7.5), con inhibidores de fosfatas y proteasas y DTT como anteriormente, para extraer las membranas celulares. Tras la centrifugación a 1500 r.p.m. a 4°C durante 10 min separamos el sobrenadante, que corresponde a la fracción de citoplasma y membranas (FCM), y el sedimento, correspondiente a la fracción nuclear. Los núcleos fueron lavados 3 veces con 1 ml de tampón NPB y finalmente lisados en 200 μ l de RIPA, de nuevo conteniendo inhibidores de fosfatas y proteasas y DTT. Los extractos nucleares fueron sonicados y centrifugados como anteriormente, y el sobrenadante corresponde a la fracción nuclear (FN). Estas condiciones de lisis nuclear son adecuadas para los experimentos de co-inmunoprecipitación ya que, de forma general, se mantienen las interacciones proteína-proteína.

12. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los cultivos primarios se crecieron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y laminina a una densidad de 0.15×10^6 células/cm² en medio MEM. Las células se fijaron con paraformaldehído 4%, sacarosa 3.1% y fosfato sódico 50mM en H₂O durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se bloquearon durante 30 min con una solución de BSA al 1% con Tritón X-100 0.1% en PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en solución de bloqueo durante 2-3 h. La inmunoreactividad fue detectada con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos incubados durante una hora a temperatura ambiente en la misma solución de bloqueo. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje *Prolong* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) sobre los portaobjetos. Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron con un microscopio confocal LSM710 (Carl Zeiss Argentina, Buenos Aires, Argentina) con un objetivo plan-apocromático de inmersión de 63 aumentos, utilizando cada uno de los canales de forma separada. Las imágenes que se muestran son secciones individuales de 0.5-1 μ m

de grosor y fueron procesadas con los programas de adquisición y análisis de imagen (Zen2009), *Adobe Photoshop versión CS4* (Adobe Systems Inc, CA, EEUU) e *ImageJ* (NIH).

13. Inmunoprecipitación.

Lisados nucleares (LN, aproximadamente 300 µg) preparados en tampón RIPA, como se explicó anteriormente, fueron incubados en agitación durante 20 h a 4°C con 3'75 µL del anticuerpo específico para pCREB y 200 µl de Proteína G Sepharosa (Sigma Co., San Luis, MO) al 10% . A continuación las muestras se centrifugaron durante 30 s a 11000 r.p.m. y, seguidamente, los inmunocomplejos se lavaron seis veces con tampón RIPA. Finalmente, se procedió a la desnaturalización de los complejos purificados en tampón de carga, fraccionamiento mediante SDS-PAGE y análisis por *immunoblot*.

14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

La inmunoprecipitación de cromatina se realizó utilizando el reactivo *SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)* de Cell Signaling Technology, Inc. (Trask Lane Danvers, MA, EEUU) según las instrucciones del fabricante, aunque con algunas modificaciones, como un mayor número de células (6×10^7) a 14 DIVs. El entrecruzamiento de la proteína y el DNA se realizó con paraformaldehído al 1% a temperatura ambiente durante 10 min, momento en que se detuvo la reacción mediante la adición de altas concentraciones de glicina (0'125 M) durante 5 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS y se rascaron de la placa en PBS conteniendo PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM. Tras la lisis de la membrana celular y la sedimentación de los núcleos, estos fueron incubados con nucleasa micrococcal para fragmentar el DNA hasta tamaños medios de entre 150-200 pb. Una vez parada esta reacción, se sedimentaron y lisaron los núcleos para obtener la cromatina entrecruzada con sus proteínas interaccionantes. Seguidamente se procedió a la inmunoprecipitación, usando 10 µg de DNA de cromatina por cada IP que fueron convenientemente diluidos en el tampón de ChIP, separándose un 2% de la dilución como control del material de partida (*input*). La IP se realizó utilizando 0'5 µl y 1 µl de los anticuerpos específicos para CREB y pCREB, respectivamente, y 10 µl y 2'5 µl de los anticuerpos *Histone H3* (usado como control positivo), y *Rabbit IgG* (usado como control negativo), respectivamente. Todos ellos fueron incubados durante 20 h a 4°C en rotación. A continuación, la cromatina fue inmunoprecipitada incubando con proteína G unida a partículas magnéticas durante 2 h a 4°C en rotación. Posteriormente, una vez lavada, la cromatina inmunoprecipitada fue eluída y separada de las partículas magnéticas mediante un imán. Tras revertir el entrecruzamiento, el DNA

Materiales y métodos

inmunoprecipitado fue purificado, cuantificándose mediante PCR cuantitativa en tiempo real la presencia en el mismo de las siguientes secuencias del promotor de *glun1*:

- Los dos elementos CRE de la región -343/-296, utilizando los oligonucleótidos S-5'-GGGACCACACGGATGATTGC-3' y AS-5'-TTTGGCGCTGCTCGAACACC-3', que amplifican una secuencia de 255 pb.
- El elemento MEF2 en posición -812/-789, utilizando los oligonucleótidos S-5'-CTAAGTAACAGAACCAAGAAGGT-3' y AS-5'-CTCAGTATTGTAGGAGAGTTCGGT-3', que amplifican una secuencia de 121 pb.
- El elemento MEF2 en posición -2363/-2341, utilizando los oligonucleótidos S-5'-ACCACCCAATCCGCGAGTAG-3' y AS-5'-ATCCCTGTCCCTGTCCTC-3', que amplifican una secuencia de 131 pb.

La eficiencia de la IP se calculó expresando la señal obtenida en cada IP como porcentaje del *input* de cromatina utilizando la fórmula:

$$\% \text{ input} = 2\% \times 2^{(C[T] \text{ 2\% Input} - C[T] \text{ IP Muestra})}$$

siendo $C[T] = C_T$ = Ciclo umbral de la reacción de PCR.

15. Análisis *in silico* del promotor de *glun1*.

La secuencia genómica de *glun1* correspondiente a 5'4 kb *upstream* del inicio de la traducción (considerado como el nucleótido +1 de este gen según los trabajos iniciales del Dr. G. Bai) fue analizada mediante las plataformas Genomatix (www.genomatix.de), concretamente el subprograma MatInspector, ORCA/JASPAR (www.cisreg.ca) y TFsearch (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html). Estos programas trabajan de forma similar, realizando búsquedas en la secuencia promotora de elementos de unión para FTs que poseen en sus bases de datos. El programa MatInspector trabaja con una serie de familias de matrices (*matrix families*) que reflejan las secuencias de unión conservadas de las diferentes familias donde se engloban los FTs. Es posible modificar el parámetro *matrix similarity* de modo que cuanto más próximo sea a 1 mejor conservado está el elemento de unión encontrado respecto al elemento modelo de la familia. En la identificación de sitios de unión en el promotor de *glun1* hemos elegido para este parámetro un valor de 0'75. Los otros dos programas, TFsearch y ORCA/JASPAR, usan matrices similares pero trabajan en porcentajes, no en números enteros. En estos casos, elegimos un 75% de *threshold score* o *matrix score*, respectivamente.

16. Ensayo de la actividad de promotores.

Cultivos primarios neuronales de 11 DIVs (aproximadamente 0.4×10^6 células) fueron transfectadas con $0.5 \mu\text{g}$ de un vector reportero que codifica el gen de la luciferasa (por ejemplo pGluN1 y sus derivados, pCREcons, pTRKB, etc), según se detalla en cada caso, junto con $0.07 \mu\text{g}$ del plásmido pnull-RL que expresa el gen de la *Renilla* usado como control interno de la transfección. En el inicio de esta tesis, y con objeto de realizar una doble normalización de los resultados, los cultivos primarios se co-transfectaron en paralelo con el plásmido pGL3-*basic* ($0.5 \mu\text{g}$), vector en el que está clonado el promotor de *glun1* y que se expresa de forma basal en los cultivos primarios, y pRL-null ($0.07 \mu\text{g}$). Sin embargo, dado que no se observaron cambios en los niveles de expresión de pGL3-*basic* con los distintos tratamientos realizados, salvo cuando se indica lo contrario, los valores de la actividad de la luciferasa de luciérnaga obtenidos en cada muestra sólo están normalizados respecto a pRL-null. Las transfecciones se realizaron en medio Neurobasal (Gibco, Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) con glutamax (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) usando *Lipofectamina 2000* (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y, a las 2 h de la adición de los complejos DNA/liposomas, este medio fue sustituido por medio de cultivo condicionado y la incubación continuó durante 24 h, momento en que se iniciaron los tratamientos indicados en cada caso. Finalizados estos, se prepararon extractos proteicos en los que determinamos simultáneamente las actividades de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* mediante el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega Corporation (Madison, WI, EEUU). En algunas ocasiones, según se detalla en cada caso, además de los plásmidos codificantes para lucifera y *Renilla*, también se incluyeron en las transfecciones plásmidos codificantes para cDNAs y/o pcDNA3 ($0.3 \mu\text{g}$ totales) y siRNAs (5 pmoles/pocillo M-24). Todos los ensayos de actividad promotora fueron realizados en cuatuplicado.

17. Análisis estadístico.

En algunos casos, según se indica, las gráficas mostradas representan los valores de la media y el error estándar de la media (s.e.m.) de un experimento representativo. En otros casos, representan los valores de la media \pm s.e.m. de al menos 3 experimentos independientes. Para el tratamiento estadístico de los datos cuando $n \geq 3$ se aplicó el test de la *t* de *Student* desapareada, considerando como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El trabajo anterior de nuestro grupo ha permitido establecer que la sobreactivación del NMDAR en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral afecta a la expresión del propio receptor (Gascon et al., 2005; Gascon et al., 2008b) junto a otras proteínas también relevantes para la supervivencia neuronal relacionadas física y funcionalmente con él (Lopez-Menendez et al., 2009; Vidaurre et al., 2012). En el caso concreto de la subunidad GluN1 se produce la inhibición de su transcripción génica (Gascon et al., 2005), mecanismo que participa junto con el procesamiento por calpaína de las subunidades GluN2 en la autorregulación del NMDAR (Gascon et al., 2008b). Prosiguiendo estos estudios, el objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido caracterizar en profundidad los mecanismos de regulación transcripcional de GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad.

1. Estudio de la regulación temprana de las subunidades GluN1 del NMDAR en un modelo de excitotoxicidad *in vitro*.

En primer lugar, hemos realizado experimentos para caracterizar en mayor detalle la cinética de regulación de GluN1 desde tiempos tempranos de tratamiento con NMDA, confirmando a un tiempo los resultados previos del laboratorio. Hemos utilizado un modelo celular de excitotoxicidad que reproduce *in vitro* la activación patológica de los NMDARs producida en isquemia cerebral (Choi et al., 1987) y que es más accesible y fácil de manejar que los modelos *in vivo*. Para ello, se prepararon cultivos primarios de corteza cerebral de embriones de rata de 18 días de gestación (Rose et al., 1993) que diferenciaron durante 14 *días in vitro* (DIVs) según se describe en Materiales y Métodos. En estas condiciones, los cultivos reproducen la composición celular de la corteza cerebral y, a los 14 DIVs, están formados mayoritariamente por neuronas diferenciadas ($73\% \pm 8$) (Vidaurre et al., 2012) que expresan las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del NMDAR. El resto de las células en el cultivo corresponde fundamentalmente a astrocitos y otras células gliales, que tienen papeles críticos como moduladores de la respuesta excitatoria. La proliferación de esta subpoblación fue controlada mediante la adición al medio de cultivo de citosina- β -D-arabino-furanósido (AraC, 10 μ M) a los 7 DIVs. En estos cultivos, el proceso de excitotoxicidad se induce mediante la incubación con los co-agonistas del NMDAR, NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M), tratamiento al que por simplicidad nos referiremos como “NMDA” a partir de ahora.

Los resultados previos habían mostrado una disminución rápida en los niveles de la proteína GluN1 en las neuronas estimuladas con NMDA durante 30 min, seguida de una reducción más progresiva a tiempos mayores de tratamiento (4 y 8 h) (Gascon et al., 2005). Con objeto de

Resultados

profundizar en la cinética de regulación de GluN1, en primer lugar realizamos tratamientos más breves de los cultivos primarios con NMDA (0, 2, 5, 15 min), así como durante 30, 60, 120 o 240 min. Los niveles de expresión de GluN1 se determinaron por inmunodetección de la proteína transferida a filtros de nitrocelulosa utilizando un anticuerpo dirigido contra uno de sus dominios extracelulares (Fig. 11A), cuantificando los resultados correspondientes a 4 experimentos independientes (Fig. 11B).

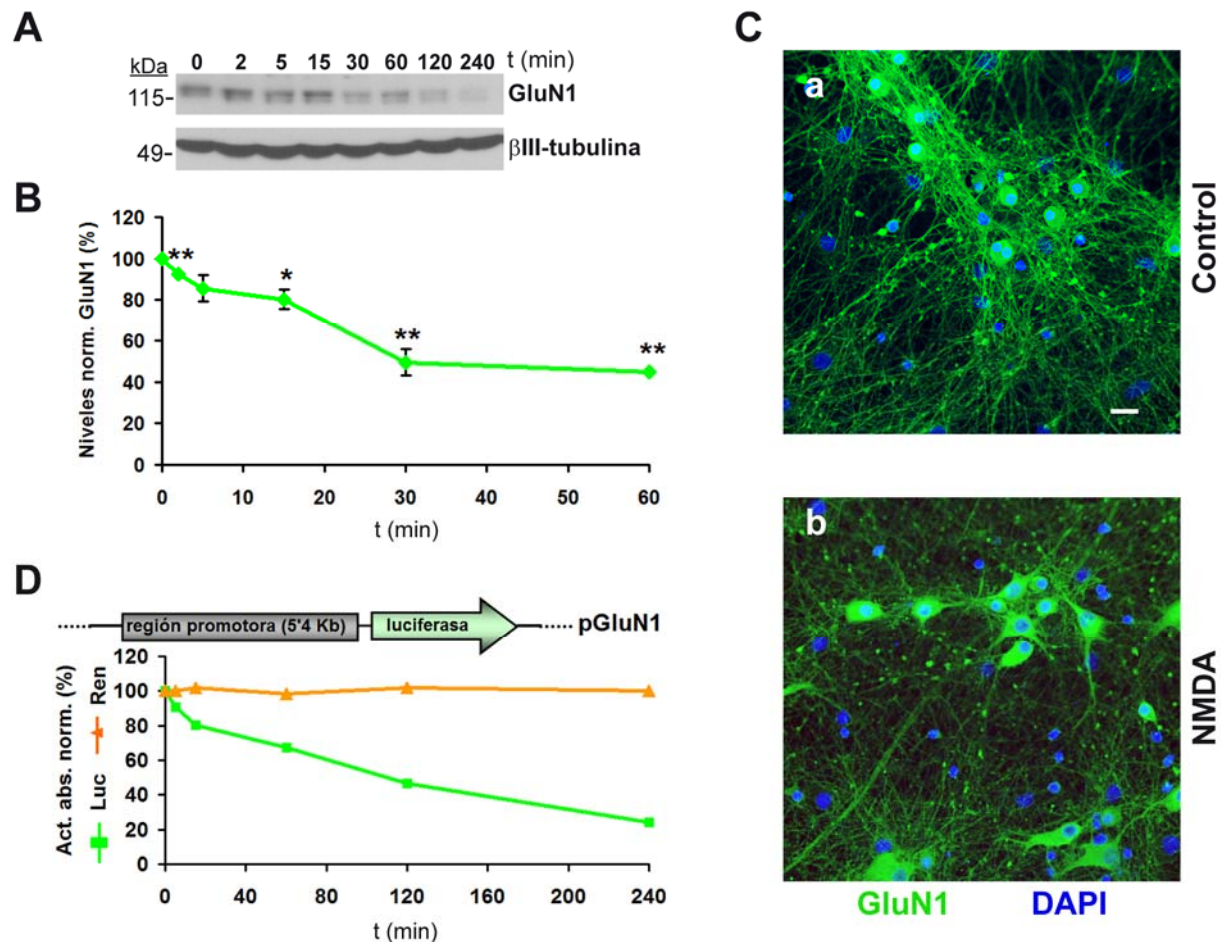


Figura 11. Análisis de la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad. **A)** Estudio por *immunoblot* de cultivos primarios de neuronas corticales de 14 DIVs tratados o no con NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M) (a partir de ahora denominado tan sólo como NMDA) durante los tiempos indicados. Se muestra la expresión de GluN1 (panel superior) y β III-tubulina (panel inferior). **B)** Cuantificación de la disminución de los niveles de subunidad GluN1 a lo largo del tratamiento con NMDA. Los niveles de GluN1 se obtuvieron por análisis densitométrico de los *immunoblots* con el programa de análisis de imagen *Image J*. Los resultados se normalizaron respecto a los de la proteína β III-tubulina y se representan como valores relativos respecto a los de cultivos no tratados, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los datos representados son las medias \pm s.e.m. de 4 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **C)** Análisis por inmunofluorescencia de cultivos de neuronas corticales sin tratar (panel a) o tratados (panel b) durante 30 min con NMDA como anteriormente. Se realizó inmunotinción con el anticuerpo anti-GluN1 (verde) en células fijadas y permeabilizadas. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes muestran resultados representativos y corresponden a secciones individuales de microscopía confocal en las que aparecen los dos canales fusionados. Barra de escala: 10 μ m. **D)** Análisis de la cinética de regulación de la actividad del promotor de *glun1* en excitotoxicidad. Los cultivos primarios de 11 DIVs fueron co-transfectados con el plásmido pGluN1, que contiene 5.4 kb del promotor de GluN1 acoplado al gen de la luciferasa de la luciérnaga y, como control, el plásmido pRL-null, que contiene el gen de la luciferasa de la *Renilla*. Veinticuatro horas después de la transfección (12 DIVs), las células fueron tratadas con NMDA como anteriormente durante los tiempos indicados (0-240 min). Los valores obtenidos para las actividades luciferasa de la luciérnaga (cuadrados verdes) o de la *Renilla* (rombos naranjas) se representan directamente sin normalizar, como valores absolutos. Se muestran valores medios \pm s.d. de un experimento representativo realizado en cuatuplicado.

En comparación con las células sin tratar, observamos una disminución rápida y significativa en los niveles de GluN1 desde tiempos muy tempranos de tratamiento, siendo 15 min de estimulación con NMDA suficientes para reducir estos hasta un $80\% \pm 5$ ($*p < 0.05$) respecto a los obtenidos en las células control. Tras 30 min de tratamiento, los niveles de esta subunidad alcanzaron un $49\% \pm 6$ ($**p < 0.01$), siendo la disminución más progresiva a tiempos posteriores. Por el contrario, el tratamiento con NMDA no tuvo un efecto significativo a los tiempos estudiados en los niveles de otras proteínas neuronales, como la β III-tubulina, confirmando que la regulación de GluN1 en condiciones excitotóxicas es específica y no consecuencia indirecta de un proceso generalizado de muerte neuronal. De hecho, a 1 h de tratamiento con NMDA, la viabilidad neuronal mostró tan solo una pequeña disminución respecto a la de los cultivos sin tratar (27%, $*p < 0.05$) (resultados no mostrados), valor que contrasta con la elevada reducción en los niveles de GluN1 (55%, $***p < 0.001$) (**Fig. 11B**).

Los efectos tempranos del tratamiento con NMDA sobre la expresión de GluN1 y la morfología neuronal fueron analizados a continuación mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (**Fig. 11C**). La intensidad de la señal característica para GluN1, distribuida tanto en el cuerpo neuronal como en las dendritas y terminaciones sinápticas de los cultivos sin estimular (**Fig. 11C, panel a**), disminuyó notablemente como consecuencia de la estimulación con concentraciones excitotóxicas de NMDA durante tan sólo 30 min (**Fig. 11C, panel b**). Además, en las neuronas tratadas, ya es posible observar el adelgazamiento de las neuritas y la aparición de varicosidades a lo largo de las proyecciones neuronales (**Fig. 11C, panel b**), cambios morfológicos característicos del proceso excitotóxico (Park et al., 1996).

La regulación de GluN1 en excitotoxicidad es producida fundamentalmente por la inhibición de la transcripción del gen codificante para esta subunidad, *glun1*, mediada por su región promotora 5' proximal (Gascon et al., 2005). Por ello, en esta tesis han resultado de gran utilidad los ensayos con genes reporteros, que han permitido examinar la actividad del promotor de *glun1* en distintas condiciones y el requerimiento de diversos elementos de respuesta en *cis* y proteínas en *trans* para su función. En general, para realizar este tipo de estudios, los cultivos primarios de neuronas corticales fueron transfectados con diversos plásmidos reporteros que contienen una región de DNA con actividad promotora seguida de un gen cuya expresión pueda cuantificarse de forma sencilla mediante el ensayo de su actividad enzimática. En un primer experimento quisimos analizar el efecto temprano de la excitotoxicidad sobre la actividad del promotor de *glun1* (**Fig. 11D**). Para ello, transfectamos cultivos primarios de 11 DIVs con pGluN1, anteriormente denominado pNRL 5'4 kb (Bai et al., 2003), un plásmido que contiene 5'4 kb de la región proximal de este promotor clonada en el vector pGL3-basic, es decir, acoplada al gen de la luciferasa de luciérnaga (**Fig. 11D, esquema superior**). Como control interno de la transfección, las células fueron cotransfectadas con pequeñas

Resultados

cantidades del plásmido pRL-null, que contiene el gen de la luciferasa de *Renilla* sin elementos *enhancer* o promotores y es capaz de dirigir la expresión de forma constitutiva de bajos niveles de esta luciferasa. A las 24 h de la transfección (DIVs 12), el proceso de excitotoxicidad se indujo en los cultivos mediante su tratamiento con NMDA (100 μ M) durante diferentes tiempos (0, 5, 15, 60, 120 y 240 min), determinándose a continuación las actividades luciferasa presentes en los extractos celulares (**Fig. 11D**). Como se puede observar, los niveles absolutos de expresión de la luciferasa de *Renilla* no fueron modificados por el tratamiento con NMDA por lo que, en experimentos posteriores, pudieron ser utilizados para la normalización de los resultados. Por otra parte, el análisis de la expresión de luciferasa mediada por pGluN1 mostró una disminución de forma muy temprana tras el tratamiento con NMDA, siendo suficientes 15 min para alcanzar valores del $80\% \pm 3$ con respecto a los de las células sin tratar. La actividad de este promotor disminuyó hasta un $46\% \pm 2$ y un $24\% \pm 2$ después de 2 y 4 h de tratamiento, respectivamente, mostrando que la regulación transcripcional de GluN1 en excitotoxicidad se inicia de forma muy temprana y depende principalmente de elementos de regulación comprendidos en la región promotora proximal.

Todos estos resultados en conjunto muestran que la regulación negativa de la subunidad GluN1 del NMDAR se induce de manera temprana en condiciones de excitotoxicidad, y no es debida a la muerte neuronal sino a un mecanismo de tipo transcripcional mediado por elementos de la región promotora proximal del gen *glun1*.

2. Identificación *in silico* de elementos reguladores de la transcripción en la región promotora proximal del gen *glun1*.

La inhibición de la transcripción de *glun1* en excitotoxicidad está mediada por secuencias presentes en su región promotora proximal y, por ello, decidimos realizar un estudio *in silico* mediante programas informáticos dirigidos a la predicción de elementos de regulación en *cis* en las regiones promotoras. Estas aproximaciones, aunque limitadas, permiten una caracterización preliminar de las secuencias de reconocimiento para FTs con funciones activadoras o represoras utilizando las bases de datos existentes. En este estudio, hemos utilizado principalmente la plataforma Genomatix (www.genomatix.de), concretamente el subprograma MatInspector, corroborado las predicciones con otras herramientas informáticas como *TFsearch* (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) y ORCA/JASPAR (www.cisreg.ca). Utilizando un valor de 0.75 para el parámetro *matrix similarity* del programa MatInspector, y un 75% de *threshold score* o *matrix score* para *TFsearch* y ORCA/JASPAR, respectivamente, se obtuvieron predicciones muy similares de los elementos de respuesta del promotor de *glun1*, aunque con resultados variables en cuanto a su valor estadístico. La **figura 12** muestra una selección de los sitios principales de unión

para FTs en el promotor proximal de GluN1, entre los que destacan elementos de tipo NFκB, Egr 1 y 3, Sp1, CRE, MEF2 y RE1, concentrados mayoritariamente en las secuencias más proximales. Es interesante resaltar que, entre estos elementos, algunos de ellos corresponden a secuencias descritas anteriormente en la literatura como participantes en la regulación de la expresión de GluN1 durante el desarrollo (**Fig. 12, resultados en negrita y cursiva**).

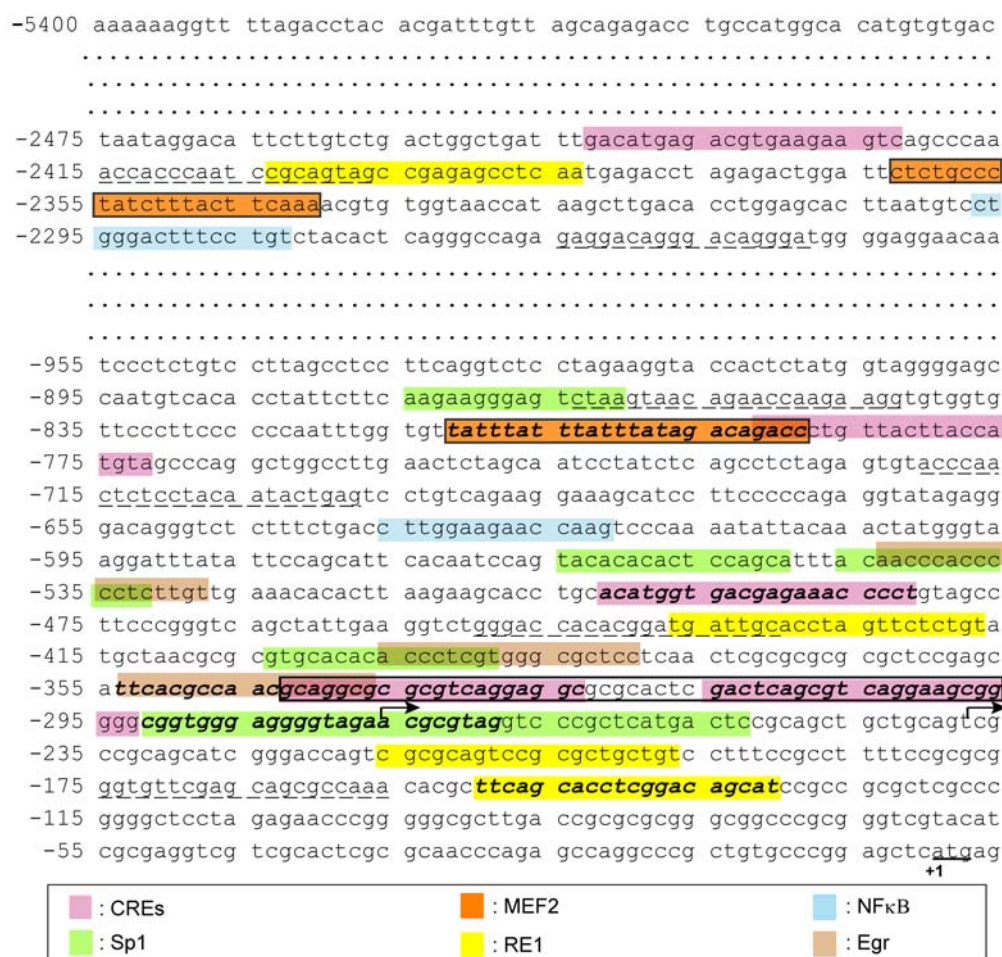


Figura 12. Región promotora proximal del gen *glun1*. Secuencia parcial del promotor del gen *glun1* contenida en el plásmido pGluN1 (5'4 Kb) mostrando las secuencias de reconocimiento identificadas *in silico* (cajas de colores) y, de entre ellas, aquellas coincidentes con secuencias previamente descritas en la literatura (resaltadas en negrita y cursiva). Los programas Genomatix, ORCA/JASPAR y TFsearch permitieron predecir sitios de unión para diversos FTs: secuencias RE1 para la unión de REST (amarillo), Sp1 (verde), CRE para la unión de CREB (rosa), MEF2 (naranja), Egr (marrón claro) y NFκB (azul). Se indica la posición del nucleótido +1 de esta secuencia (subrayado), que coincide con el inicio de la traducción (ATG), y los dos inicios de transcripción mayoritarios (TSSs) mediante flechas. Las secuencias MEF2 y CRE caracterizadas en detalle en este trabajo y las delecciones realizadas para ello se indican mediante un recuadro. Los oligonucleótidos usados en los experimentos de ChIP se muestran subrayados con línea discontinua.

Es de destacar la presencia de 3 motivos de tipo CRE en posiciones -315/-293, -343/-324 y -502/-482 (Lau et al., 2004), un elemento MEF2 en la posición -809/-795 (Krainc et al., 1998), una secuencia RE1 en la posición -150/-131 (Bai et al., 2003) y un elemento Egr3 en la posición -354/-337 (Kim et al.,

Resultados

2012). En esta figura también se indican el origen de traducción (**Fig. 12, subrayado**), establecido como el nucleótido +1 de esta secuencia, y los orígenes mayoritarios de la transcripción: uno proximal en posición -238 principalmente reconocido en cerebro, y otro distal en el nucleótido -276 reconocido en células PC12 (Bai and Kusiak, 1997). Finalmente, la **figura 12** muestra también las secuencias CRE y MEF2 que, como veremos más adelante, han sido caracterizadas en detalle en este trabajo (**Fig. 12, cajas**) y los oligonucleótidos empleados en los ensayos de ChIP para la detección de la interacción de pCREB con dichos elementos reguladores (**Fig. 12, subrayado en línea discontinua**).

3. Identificación de los elementos CRE y MEF2 necesarios para la regulación del promotor del gen *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad y análisis de sus posibles sinergias.

Los FTs CREB (Lau et al., 2004) y MEF2C (Krainc et al., 1998) son importantes en la activación de la transcripción del gen *glun1* durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, algunas evidencias sugieren la inactivación de dichos FTs en condiciones de sobreactivación del NMDAR (Bolger and Yao, 2005; Calderone et al., 2003; Gong et al., 2003; Hardingham et al., 2002; Plaisance et al., 2005). Por tanto, nos planteamos analizar si la respuesta del promotor de *glun1* a dosis diferentes de NMDA reproduciría en los cultivos primarios sus estados de activación/represión y, en ese caso, ésta estaría mediada por los FTs CREB y MEF2 a través de elementos reguladores en *cis* de tipo CRE y/o MEF2.

3.1. Caracterización de la actividad del promotor de *glun1* en respuesta a la concentración de NMDA: posible regulación por elementos CRE y MEF2.

La represión de la actividad del promotor de *glun1* en los cultivos primarios neuronales, demostrada en presencia de concentraciones de NMDA de 100 μ M, nos llevó a preguntarnos cuál sería la respuesta de dicho promotor a concentraciones menores de agonista. Por ello, los cultivos primarios (11 DIVs) fueron transfectados con los plásmidos pGluN1 y pRL-null como anteriormente y, tras 24 h, tratados durante 2 h con distintas concentraciones de NMDA (0-100 μ M) acompañadas de su co-agonista glicina (10 μ M). Como podemos observar en el histograma (**Fig. 13A**), que representa valores medios normalizados de tres experimentos independientes, la actividad del promotor de la subunidad GluN1 aumentó en presencia de concentraciones de NMDA menores a 10 μ M alcanzando su máximo para la concentración de 1 μ M ($159\% \pm 3$, $**p < 0.01$), regulándose progresiva y negativamente a concentraciones más elevadas de agonista. La inhibición de la actividad promotora fue máxima para una concentración de NMDA de 100 μ M, condiciones en las

que la actividad luciferasa era tan sólo un $55\% \pm 3$ ($**p<0'01$) de la correspondiente a los cultivos sin tratar. Una dependencia similar respecto a la concentración de NMDA fue observada para los niveles de proteína GluN1 obtenidos en neuronas de 14 DIVs tratadas durante 4 h con iguales concentraciones de NMDA (Fig. 13A, panel adjunto).

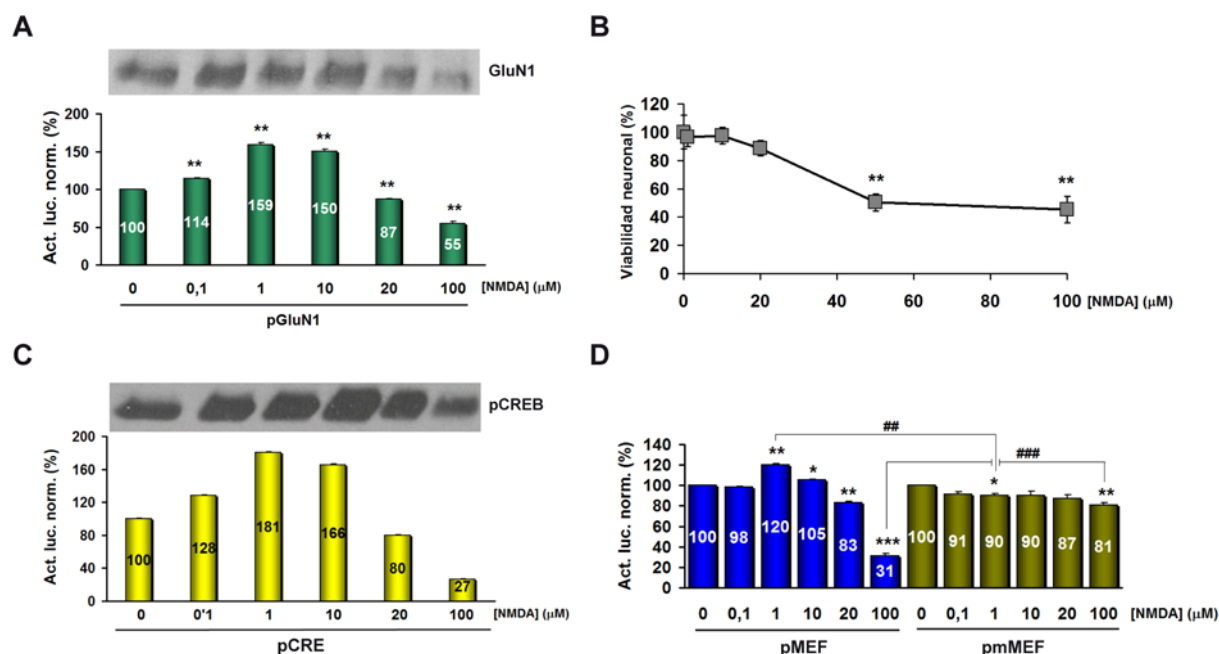


Figura 13. Estudio de la regulación de GluN1 y de la actividad de promotores canónicos CRE y MEF2 en respuesta a distintas concentraciones de NMDA. **A)** Caracterización de la actividad del promotor *gluN1*. Cultivos primarios neuronales (11 DIVs) fueron co-transfectados con pGluN1 (0'5 μ g) y pRL-null (0'07 μ g). Veinticuatro horas después (12 DIVs), los cultivos se trataron con glicina (10 μ M) y distintas concentraciones de NMDA (0-100 μ M) durante 2 h. En este experimento la actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como valores relativos a aquellos obtenidos en las células sin tratar a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. $**p<0'01$. En paralelo, se muestra el análisis por *immunoblot* de los niveles de GluN1 en cultivos primarios de 14 DIVs tratados con iguales concentraciones de NMDA. **B)** Efecto de la concentración de NMDA sobre la viabilidad neuronal. Cultivos primarios neuronales (14 DIVs) se trataron con glicina (10 μ M) y diferentes concentraciones de NMDA (0-100 μ M) durante 6 h. La viabilidad neuronal se estableció mediante ensayos de reducción de la sal de tetrazolio (MTT), descontando la contribución de la sub-población glial como se indicó en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como valores relativos a los obtenidos en las células sin tratar, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. $**p<0'01$. **C)** Caracterización de la actividad del promotor CRE canónico. Cultivos primarios transfectados como anteriormente con pCRE, plásmido que contiene dos elementos CRE del promotor de TrkB, y pRL-null fueron tratados con NMDA (2 h) como se indicó. La actividad luciferasa también se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar, mostrándose los valores medios \pm s.d. de un experimento representativo. Se muestra también el análisis por *immunoblot* de los niveles de pCREB en cultivos primarios de 14 DIVs tratados con iguales concentraciones de NMDA. **D)** Cultivos primarios transfectados y tratados como anteriormente con pRL-null y pMEF, plásmido que contiene dos elementos MEF2 del gen Nur77, o pmMEF, que presenta mutaciones en ambos sitios. Los datos de actividad luciferasa se presentan doblemente normalizados y corresponden a valores medios \pm s.e.m., tal como se indicó en el experimento realizado con pGluN1. $n=3$; $*p<0'05$; $**p<0'01$; $***p<0'001$. También se muestran comparaciones de la actividad luciferasa obtenida en cultivos transfectados con pMEF y pmMEF en presencia de concentraciones de NMDA de 1 o 100 μ M. $##p<0'01$; $###p<0'001$.

Resultados

El estudio en paralelo del efecto del tratamiento con NMDA sobre la viabilidad neuronal mostró que aquellas concentraciones inferiores a 10 μM no resultan tóxicas para las neuronas, que mantienen una viabilidad cercana al 100% tras 6 h de tratamiento (**Fig. 13B**). Sin embargo, tal como se describió anteriormente (Koh and Choi, 1988), concentraciones mayores resultan altamente tóxicas siendo, por ejemplo, los valores de viabilidad de los cultivos tratados con 100 μM NMDA del $45\% \pm 9$ ($**p < 0.01$) respecto a los de las células sin estimular. La dosis de 20 μM , que no resultaba muy tóxica a las 6 h de tratamiento, si que lo era para incubaciones más prolongadas con el agonista (datos no mostrados).

Como se mencionó anteriormente, los datos publicados en la literatura sugerían fuertemente que la respuesta de este promotor a las diferentes dosis de NMDA analizadas podría estar mediada por elementos reguladores en *cis* de tipo CRE y/o MEF2. Para tratar de comprobar esta hipótesis, en primer lugar analizamos el efecto del NMDA sobre la actividad de promotores canónicos CRE (**Fig. 13C**) y MEF2 (**Fig. 13D**). En primer lugar, los cultivos primarios fueron transfectados como anteriormente con el plásmido pCRE, que contiene dos elementos CRE funcionales del promotor de TrkB (Deogracias et al., 2004), y pRL-null. Al igual que ocurría para pGluN1, las concentraciones de NMDA menores a 10 μM dieron lugar a un aumento de la actividad de este promotor, alcanzándose un valor máximo de 180% respecto a los cultivos sin tratar para la concentración de 1 μM (**Fig. 13C**). Sin embargo, las concentraciones de NMDA superiores a 10 μM provocaban una disminución muy acusada de la actividad de este promotor, alcanzándose valores del 27% para la concentración de 100 μM de NMDA. Estos resultados se correlacionan con los niveles del FT CREB activado, establecidos mediante el análisis de la fosforilación en el residuo Ser133 (pCREB; **Fig. 13C, panel adjunto**), y con datos en la bibliografía que muestran la activación de CREB acoplada a la estimulación de los NMDARs sinápticos y su inhibición de forma dominante por la activación de los extrasinápticos (Hardingham et al., 2002; Papadia et al., 2005). A continuación, analizamos el efecto de la concentración de NMDA sobre la actividad de un promotor MEF2 canónico, realizando experimentos similares a los anteriores utilizando el plásmido pMEF, que contiene dos elementos MEF2 del gen Nur77 (Woronicz et al., 1995) (**Fig. 13D**). El análisis de tres experimentos independientes dio lugar a resultados muy similares a los obtenidos anteriormente para pGluN1 y pCRE. Los efectos activadores y represores del NMDA sobre la actividad del promotor MEF2 canónico estaban mediados fundamentalmente por los elementos de respuesta MEF2, ya que su mutación bloqueó la activación propia de concentraciones no tóxicas y redujo fuertemente la inhibición debida al uso de concentraciones excitotóxicas de NMDA (**Fig. 13D**). Así, en las células transfectadas con el plásmido pmMEF, la actividad del promotor en presencia de la concentración de NMDA de 1 μM fue significativamente inferior a la obtenida para pMEF en iguales condiciones ($90\% \pm 2$ versus $120\% \pm 1$, $^{###}p < 0.01$) mientras que los valores obtenidos para la concentración de

100 μ M fueron significativamente superiores ($81\% \pm 2$ versus $31\% \pm 3$, $^{###}p < 0.01$). Por tanto podemos concluir que el tratamiento de los cultivos primarios con NMDA, en función de la concentración de agonista utilizada, tiene un efecto activador o inhibidor sobre promotores canónicos CRE y MEF2, y no así sobre una forma inactiva de este último.

En conjunto, los resultados de esta figura permiten concluir que el promotor proximal de la subunidad GluN1 del NMDAR responde a la concentración de NMDA siguiendo un patrón muy similar al de los promotores canónicos CRE y MEF2, lo que sugiere una gran importancia de los FTs CREB y MEF2 en la regulación de la expresión de este gen tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. La inhibición de la actividad de todos estos promotores está asociada a la utilización de concentraciones de agonista capaces de inducir el proceso de excitotoxicidad, mientras que las concentraciones sub-tóxicas de NMDA tienen un papel activador.

3.2. Identificación de los elementos CRE y MEF2 participantes en la regulación del promotor de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad.

Con objeto de demostrar la participación de los FTs MEF2 y CREB en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y en excitotoxicidad, tal como sugerían los experimentos anteriores, identificando además las secuencias responsables de dicha regulación, decidimos generar diversas delecciones de elementos reguladores MEF2 y CRE presentes en el promotor de *glun1*.

En primer lugar, utilizando el plásmido pGluN1, generamos dos mutantes en los que se eliminaron las secuencias MEF2 presentes en posiciones -812/-789 y -2363/-2341 a los que denominamos respectivamente pGluN1 Δ MEF (-812/-789) y pGluN1 Δ MEF (-2363/-2341) (Fig. 12, los nucleótidos exactamente delecionados se resaltan mediante una caja). El primer mutante corresponde al elemento descrito en la literatura como un sitio de interacción de MEF2C, importante para la regulación de GluN1 durante el desarrollo (Krainc et al., 1998), mientras que el segundo no ha sido caracterizado con anterioridad. Además, generamos un mutante doble, que posee ambas secuencias delecionadas, al que denominamos pGluN1 Δ MEF. Seguidamente, estudiamos el efecto sobre la actividad promotora de pGluN1 de la delección estos sitios respecto a la forma salvaje del promotor, tanto en condiciones basales (Fig. 14A) como de excitotoxicidad (Fig. 14B). Para ello, utilizamos cultivos primarios corticales de 11 DIVs donde se co-transfectaron los plásmidos pGluN1 Δ MEF (-812/-789), pGluN1 Δ MEF (-2363/-2341) y pGluN1 Δ MEF junto con pRL-null, y se compararon con los resultados obtenidos al transfectar pGluN1 y pRL-null. La actividad luciferasa normalizada de un experimento representativo, realizado en cultivos no estimulados con NMDA, mostró el requerimiento de las secuencias MEF2 en posiciones -812/-789 y -2363/-2341 para la función del promotor *glun1*, alcanzándose valores respectivamente del $56\% \pm 1$ y del $77\% \pm 1$ al

Resultados

delecionar las mismas respecto a los obtenidos con el promotor salvaje (**Fig. 14A**). La inhibición de la actividad promotora se hizo más evidente al delecionar juntos los dos sitios MEF2 anteriores, llegando a disminuir esta hasta un $43\% \pm 1$ (**Fig 14A**). A continuación, nos propusimos estudiar el papel de estos mismos elementos de respuesta en la regulación de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad. Para ello, tratamos cultivos neuronales transfectados como anteriormente con NMDA durante 2 h (**Fig. 14B**). El resultado de un experimento representativo mostró que el efecto de cada uno de los elementos MEF2 analizados sobre la regulación de *glun1* en condiciones de excitotoxicidad era muy similar y, además, dichos efectos parecían ser aditivos. En conjunto, estos resultados muestran por primera vez la existencia de un segundo elemento MEF2 de regulación en el promotor proximal de la subunidad GluN1 del NMDAR en posición -2363/-2341 que, junto al identificado con anterioridad en posición -812/-789 (Krainc et al., 1998), regula la actividad basal de dicho promotor en cultivos primarios neuronales. Adicionalmente, ambas secuencias son necesarias para la inhibición de la actividad del promotor de *glun1* en condiciones de excitotoxicidad, siendo sus efectos probablemente aditivos tanto en las condiciones basales como de excitotoxicidad.

En el caso de CREB, y como primera aproximación, generamos un mutante de pGluN1 al que denominamos pGluN1 Δ CRE (-343/-296) en el que se eliminaron de forma conjunta dos de los tres elementos CRE proximales (-343/-324 y -315/-296) descritos con anterioridad (**Fig. 12**, como anteriormente los nucleótidos delecionados se resaltan mediante una caja) (Lau et al., 2004). La mutación de los elementos CRE seleccionados fue decidida en función de resultados previos obtenidos para el plásmido reportero pNRL356, que contiene las secuencia -356/-1 del promotor de *glun1* y fue cedido por el Dr. Bai (Bai and Kusiak, 1995). Los niveles de actividad luciferasa inducidos por transfección de los cultivos primarios con este vector disminuyeron hasta el $54\% \pm 3$ ($**p<0'01$) tras el tratamiento con NMDA (resultados no mostrados), sugiriendo que la secuencia 356/-1 del promotor de *glun1* contiene una parte importante de los elementos de respuesta necesarios para su regulación en excitotoxicidad. Una vez obtenido pGluN1 Δ CRE (-343/-296), y con objeto de caracterizar un posible efecto conjunto de los elementos CRE y MEF2, generamos un mutante cuádruple en el que se delecionaron los dos sitios MEF2 mencionados anteriormente y estos dos elementos CRE del promotor de *glun1*, al que denominamos pGluN1 Δ CRE Δ MEF. Caracterizamos a continuación el efecto de estas delecciones sobre la actividad promotora, de igual forma que hicimos anteriormente con los mutantes MEF2. Como podemos observar (**Fig. 14C, parte a**), en condiciones basales, la delección de los dos sitios CRE o MEF2 hizo disminuir la actividad luciferasa respectivamente hasta el $61\% \pm 1$ ($***p<0'001$) y el $32\% \pm 2$ ($***p<0'001$) con respecto al promotor salvaje ($n=3$). Además, la actividad basal del promotor de GluN1 tenía un requerimiento notoriamente superior por elementos de regulación MEF2 que por los de tipo CRE, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas ($^{##}p<0'01$). Por otra parte, en un experimento inicial, los

cultivos neuronales fueron transfectados con pGluN1 Δ CRE Δ MEF y pRL-null como anteriormente observándose una disminución de la actividad luciferasa basal hasta valores del 22 % \pm 2 respecto a los obtenidos para pGluN1 (**Fig. 14C, parte b**). Por tanto, estos resultados demuestran la importancia de las secuencias reguladoras situadas en posición -343/-296 junto con los sitios MEF2 en -812/-789 y -2363/-2341 para la regulación basal de GluN1, y sugieren que los efectos de todos estos elementos reguladores son aditivos en condiciones no neurotóxicas.

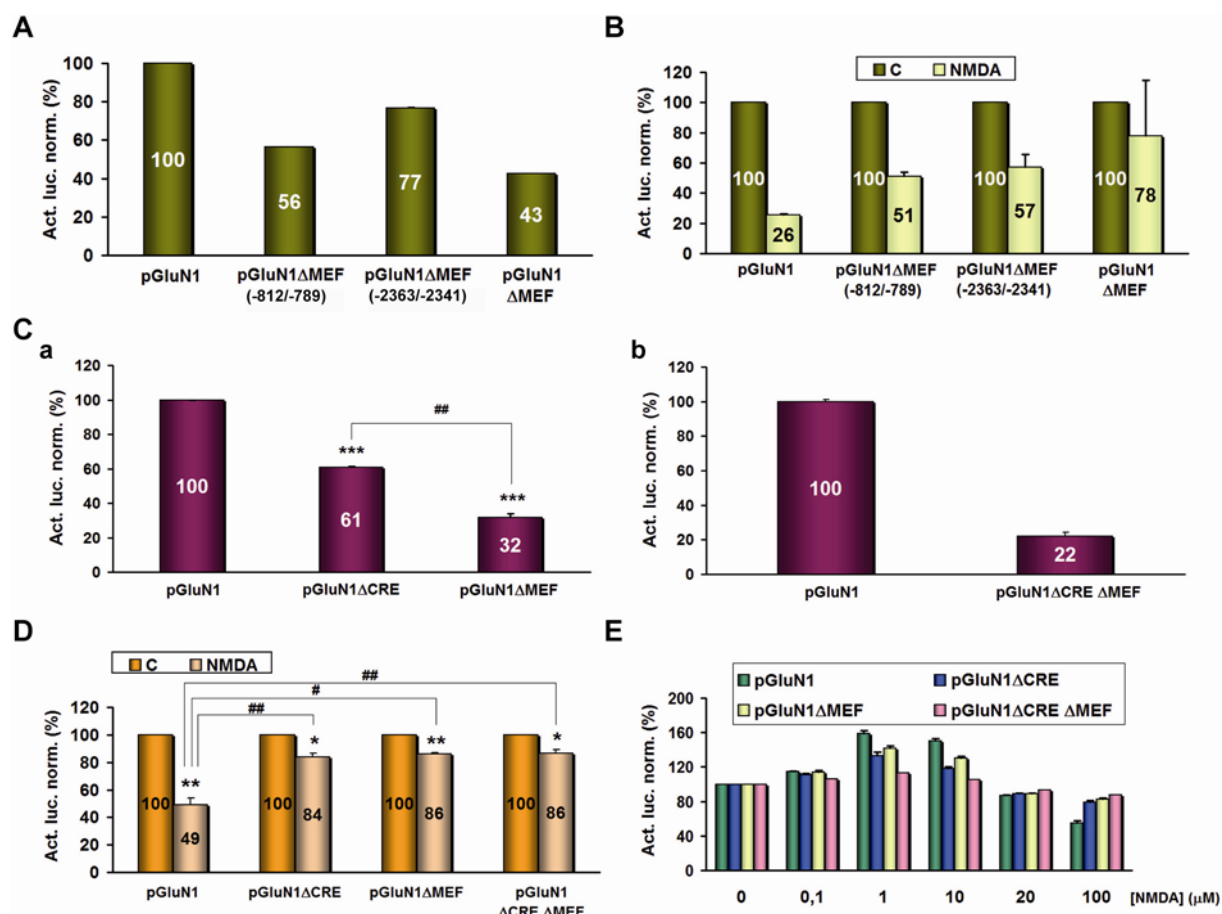


Figura 14. Identificación de los elementos de respuesta MEF2 y CRE importantes para la regulación del promotor *glun1* y análisis de su participación en condiciones basales y de excitotoxicidad. Los cultivos primarios neuronales (11 DIVs) fueron co-transfectados con pRL-null (0'07 μ g) y 0'5 μ g de cada uno de los plásmidos pGluN1, pGluN1 Δ MEF (-812/-789), pGluN1 Δ MEF (-2363/-2341), pGluN1 Δ MEF, pGluN1 Δ CRE o pGluN1 Δ CRE Δ MEF según se indica en cada histograma. Veinticuatro horas después (12 DIVs), las células transfectadas se analizaron directamente (**A**, **C**), o se trataron durante 2 h con glicina (10 μ M) y NMDA (100 μ M) (**B**, **D**) o distintas concentraciones NMDA (0-100 μ M) (**E**). En todos los casos, la actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar, a las que arbitrariamente se asignó un valor de 100%. Se muestran los valores medios \pm s.d. de un experimento representativo (**A**, **B**, **C**, parte **b** y **E**) o bien los valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes (**C**, parte **a**, y **D**). En estos últimos experimentos, los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. Se compararon los valores obtenidos para pGluN1 Δ CRE y pGluN1 Δ MEF respecto a pGluN1 (** p <0'001) o los de pGluN1 Δ CRE y pGluN1 Δ MEF entre sí ($^{##}$ p <0'01; **C**). También se comparan los datos de la actividad luciferasa de pGluN1, pGluN1 Δ MEF, pGluN1 Δ CRE o pGluN1 Δ CRE Δ MEF en presencia o ausencia de NMDA (* p <0'05; ** p <0'01) o los de estos tres últimos plásmidos respecto a pGluN1 en los cultivos tratados con NMDA ($^{\#}$ p <0'05, $^{##}$ p <0'01; **D**).

Resultados

Seguidamente estudiamos el papel de los sitios CRE anteriormente descritos en la regulación de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad, llevando a cabo experimentos similares a los realizados con anterioridad pero en presencia de NMDA (**Fig. 14D**). Los resultados demuestran que la secuencia -343/-296 del promotor es muy importante para la inhibición de la actividad del promotor GluN1 en condiciones de excitotoxicidad, ya que en los cultivos transfectados con pGluN1 Δ CRE la actividad luciferasa recuperó valores del $84\% \pm 3$, significativamente superiores a los obtenidos para pGluN1 ($49\% \pm 5$; $^{###}p < 0.01$). La comparación de estos resultados con los obtenidos para pGluN1 Δ MEF ($86\% \pm 5$) y pGluN1 Δ CRE Δ MEF ($86\% \pm 3$) sugiere que, si bien los elementos CRE analizados tenían menor importancia en la regulación basal de GluN1, las secuencias CRE y MEF2 tienen efectos muy similares sobre la inhibición de la actividad del promotor GluN1 en condiciones de excitotoxicidad, siendo además la presencia de ambos tipos de elementos estrictamente necesaria para dicha regulación (**Fig. 14D**).

Por último, quisimos caracterizar la contribución relativa de las secuencias CRE y MEF2 del promotor *glun1* no solo en condiciones de excitotoxicidad sino también para concentraciones de NMDA sub-tóxicas (**Fig. 14E**). Para ello, realizamos un ensayo de dosis-respuesta a NMDA (0-100 μ M) como anteriormente, comparando los cultivos transfectados con los plásmidos pGluN1 Δ CRE, pGluN1 Δ MEF y pGluN1 Δ CRE Δ MEF con aquellos que expresan pGluN1 (**Fig. 14E**). En conjunto, los datos obtenidos en las **figuras 13 y 14** permiten concluir que los elementos de respuesta MEF2 en posiciones -812/-789 y -2363/-2341 del promotor de GluN1, así como los CRE en los nucleótidos -343/-296 son necesarios tanto para la activación como para la represión del promotor proximal de esta subunidad. Adicionalmente, mientras que los efectos de CREB y MEF2 parecen ser independientes en la regulación positiva del promotor, es muy interesante que la regulación negativa inducida por concentraciones tóxicas de NMDA ocurre por un mecanismo que requiere elementos de respuesta para ambos tipos de FTs.

3.3. Análisis de la posible interacción entre el FT CREB y los sitios MEF2 y CRE del promotor de *glun1*.

Los resultados anteriores sugieren una posible cooperación entre los elementos de respuesta MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) en la regulación del promotor de *glun1* en condiciones de excitotoxicidad, que podría estar mediada por la interacción directa o indirecta de algún miembro de la familia de FTs MEF2 y CREB con dichos sitios. Para analizar esta posibilidad, y como una primera aproximación, cultivos primarios neuronales de 14 DIVs fueron tratados o no con NMDA (100 μ M) durante 30 min y, posteriormente, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos para CREB y pCREB. El DNA inmunoprecipitado

por estos anticuerpos fue analizado mediante qRT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican las secuencias donde se encuentran los elementos MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor *glun1* (**Fig. 12, subrayado en línea discontinua**). Realizamos un tratamiento de los cultivos primarios con NMDA de 30 min, tiempo para el que la represión de la actividad del promotor de *glun1* era ya evidente en los ensayos de actividad luciferasa (**Fig. 11D**). Sin embargo, como se muestra en la **figura 15A**, los niveles normalizados de pCREB alcanzaron valores del $156\% \pm 17$ ($**p<0.01$, $n=4$) respecto a los de los cultivos sin tratar sin observarse cambios significativos en los niveles totales de CREB. Este resultado sugiere que, en estas condiciones de ensayo, aunque se hayan activado los mecanismos represores de la expresión de GluN1 la actividad de CREB todavía se encuentra por encima de sus niveles basales.

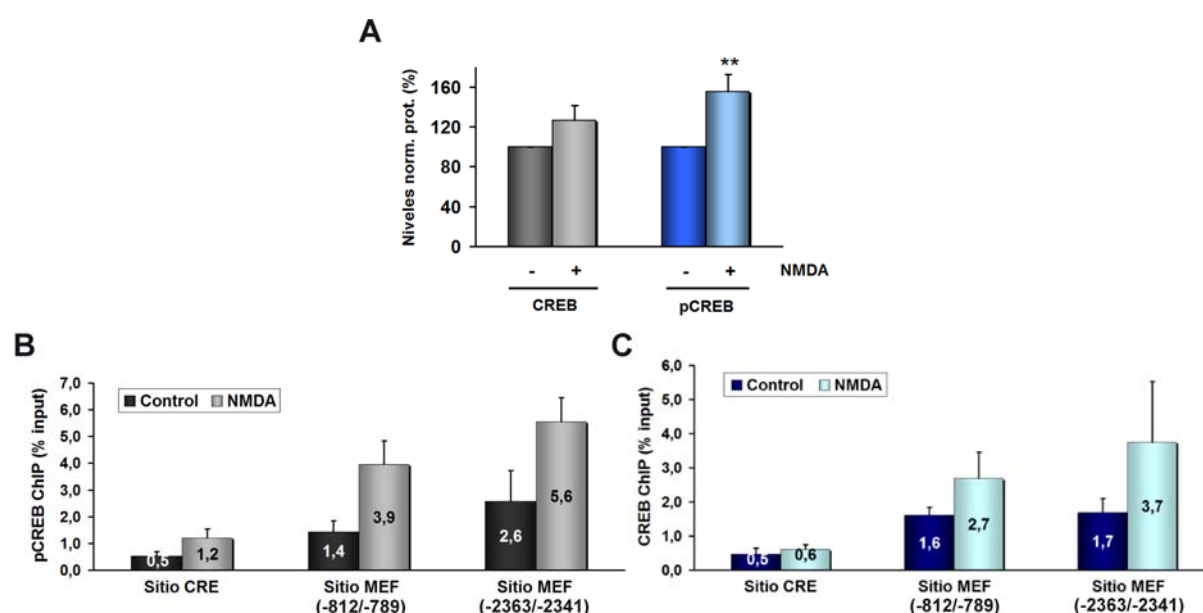


Figura 15. Análisis mediante ChIP de la posible interacción de CREB con los elementos MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor *glun1*. **A)** Cuantificación de los niveles de pCREB y CREB en cultivos primarios (14 DIVs) tratados con NMDA (100 μ M) durante 30 min. Los niveles de expresión de pCREB S133 (barras azules) y de CREB (barras grises) se obtuvieron por análisis densitométrico mediante el programa *ImageJ* de *immunoblots* realizados con anticuerpos específicos. Los resultados se normalizaron respecto a los de la proteína β III-tubulina y se representan como valores relativos respecto a los de cultivos no tratados, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los datos representados son las medias \pm s.e.m. de 4 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada ($**p<0.01$). **B)** y **C)** Cultivos primarios, estimulados o no con NMDA como anteriormente, fueron tratados con paraformaldehído para el entrecruzamiento de DNA y proteína, procesándose las muestras a continuación para la inmunoprecipitación de la cromatina según se indica en Materiales y Métodos. En el DNA inmunoprecipitado con los anticuerpos pCREB (**B**) o CREB (**C**) se cuantificó la presencia de los elementos CRE (-343/-296) y MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) del promotor *glun1* mediante qPCR con oligonucleótidos diseñados *ad hoc*. Los resultados obtenidos en cada inmunoprecipitación se presentan como porcentaje relativo respecto a los obtenidos para el DNA de partida o *input*.

Los resultados del experimento de ChIP mostraron que la fracción del DNA de partida o *input* correspondiente a los sitios CRE (-343/-296) que fue capaz de inmunoprecipitar con el anticuerpo

Resultados

para pCREB era de un $0.5\% \pm 0.2$ en las condiciones basales y aumentaba hasta alcanzar valores del $1.2\% \pm 0.3$ en excitotoxicidad (**Fig. 15B**). Estos resultados se correspondían con el mayor nivel de activación de CREB observado en estas condiciones (**Fig. 15A**). La fracción de este DNA inmunoprecipitada por el anticuerpo específico para CREB (**Fig. 15C**) no sufrió grandes cambios por el tratamiento con NMDA. Un resultado muy interesante fue que tanto los anticuerpos para CREB como los de pCREB eran capaces de inmunoprecipitar los elementos de respuesta MEF2 (-812/-789) y (-2363/-2341), apoyando la hipótesis de que existe algún tipo de interacción directa o indirecta del FT CREB con las secuencias MEF2 presentes en el promotor de *glun1* (**Figs. 15B y C**). Adicionalmente observamos que, al igual que ocurría para los elementos CRE del promotor, la interacción de las secuencias MEF2 con las proteínas CREB y pCREB se ve potenciada por el proceso de excitotoxicidad (**Figs. 15B y C**).

Estos resultados, aún siendo preliminares, sugieren la posibilidad de la formación de un complejo DNA/proteína en condiciones de excitotoxicidad, y quizá también basales, que incluiría los elementos MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor *glun1* y FTs de las familias MEF2 y CREB. Este complejo permitiría explicar la cooperación observada entre los motivos MEF2 y CRE en la regulación del promotor de *glun1* en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 14D**).

4. Regulación de la expresión de GluN1 por modulación de la vía BDNF/TrkB/ERK5/MEF2.

La activación de los NMDARs en condiciones fisiológicas promueve la supervivencia neuronal acoplada a la activación del FT CREB mediada por la fosforilación de su residuo de Ser133, y la regulación de la síntesis factores de supervivencia como BDNF (Papadia et al., 2005) y su receptor TrkB (Deogracias et al., 2004). A su vez, esa neurotrofina regula positivamente los niveles de mRNA y proteína de las subunidades del NMDAR, GluN1, GluN2A y GluN2B (Caldeira et al., 2007) por mecanismos no muy bien establecidos pero que posiblemente incluyen la activación de CREB (Lund et al., 2008). Estos datos sugieren la existencia de mecanismos de retroalimentación en la regulación génica asociada con la neurotransmisión excitatoria.

4.1. Caracterización de la inducción de la expresión de GluN1 por activación de la vía BDNF/TrkB/CREB.

En primer lugar nos planteamos caracterizar si la actividad del promotor *glun1* en los cultivos primarios pudiera estar mediada por la neurotrofina BDNF de forma basal. Para ello, cultivos primarios neuronales de 11 DIVs fueron transfectados con los plásmidos pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, y posteriormente tratados con BDNF (50 ng/ml) durante 90 min (**Fig. 16A**). Como

podemos observar, esta neurotrofina es capaz de inducir la actividad del promotor *glun1*, ya que la actividad luciferasa aumenta hasta un $136\% \pm 2$ ($***p < 0.001$) en presencia de BDNF. Esta regulación podría estar mediada a través de elementos de respuesta tipo CRE presentes en este promotor. Por ello, analizamos si otros promotores con motivos CREs como el promotor canónico (pCRE), el de TrkB (pTRKB) (Deogracias et al., 2004; Kingsbury et al., 2003) o el promotor III de BDNF (pBDNF) (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998) estaban regulados por BDNF (**Fig. 16A**). Comprobamos que todos estos promotores se regulan positivamente por BDNF, siendo los valores de actividad luciferasa en los cultivos tratados con BDNF respecto a los de células sin tratar de $156\% \pm 5$ (pCRE; $**p < 0.01$), $166\% \pm 3$ (pBDNF; $**p < 0.01$) y $128\% \pm 2$ (pTRKB; $**p < 0.01$). La activación del promotor de TrkB por BDNF se perdió parcialmente al ensayar una forma mutada del mismo (pTRKB mut) que tiene sus dos elementos CREs delecionados ($117\% \pm 2$ versus $128\% \pm 2$; $^{##}p < 0.01$), resultado que sugiere que esta regulación está mediada por activación de CREB. Por tanto, podemos concluir que GluN1 se regula positivamente por BDNF, posiblemente a través de la activación de CREB y de los motivos CRE de su promotor.

Estudiamos seguidamente mediante *immunoblot* el efecto que el BDNF tenía sobre los niveles de GluN1, comparando éstos con los obtenidos tras el tratamiento con NMDA (**Fig. 16B**). Para ello, cultivos primarios neuronales (14 DIVs) fueron tratados en paralelo con BDNF (50 ng/ml) y NMDA (100 μ M) durante 1 a 4 h. De acuerdo con los datos anteriores, el tratamiento con BDNF fue capaz de inducir gradualmente la expresión de GluN1, confirmando también resultados publicados (Caldeira et al., 2007), mientras que los niveles de subunidad disminuyeron progresivamente en presencia de NMDA. La inducción por BDNF de la actividad tirosina quinasa de su receptor TrkB se analizó mediante un anticuerpo fosfoespecífico (pTrkB) que reconoce el sitio de autofosforilación de TrkB en la Tyr515 y es utilizado como un marcador del estado de activación de la proteína Trk. Observamos que BDNF induce una fuerte activación de TrkB desde la primera hora de tratamiento, que contrasta con los pequeños niveles de actividad basal hallados en los cultivos sin tratar o su inactivación en presencia de NMDA, descrita anteriormente en el laboratorio (Vidaurre et al., 2012). Los niveles totales del receptor TrkB no mostraron cambios significativos por el tratamiento con BDNF, aunque se regularon negativa y progresivamente en presencia de NMDA como se describió (Vidaurre et al., 2012). La activación por BDNF de TrkB, como era de esperar, pudo correlacionarse con la del FT CREB, establecida mediante el anticuerpo pCREB (**Fig. 16B**). Los niveles de NSE no mostraron cambios significativos con los distintos tratamientos. Estos resultados indican que la inhibición de la cascada de señalización BDNF/TrkB/CREB podría ser un factor determinante en la inhibición de la expresión de GluN1 inducida por sobreactivación del NMDAR.

Resultados

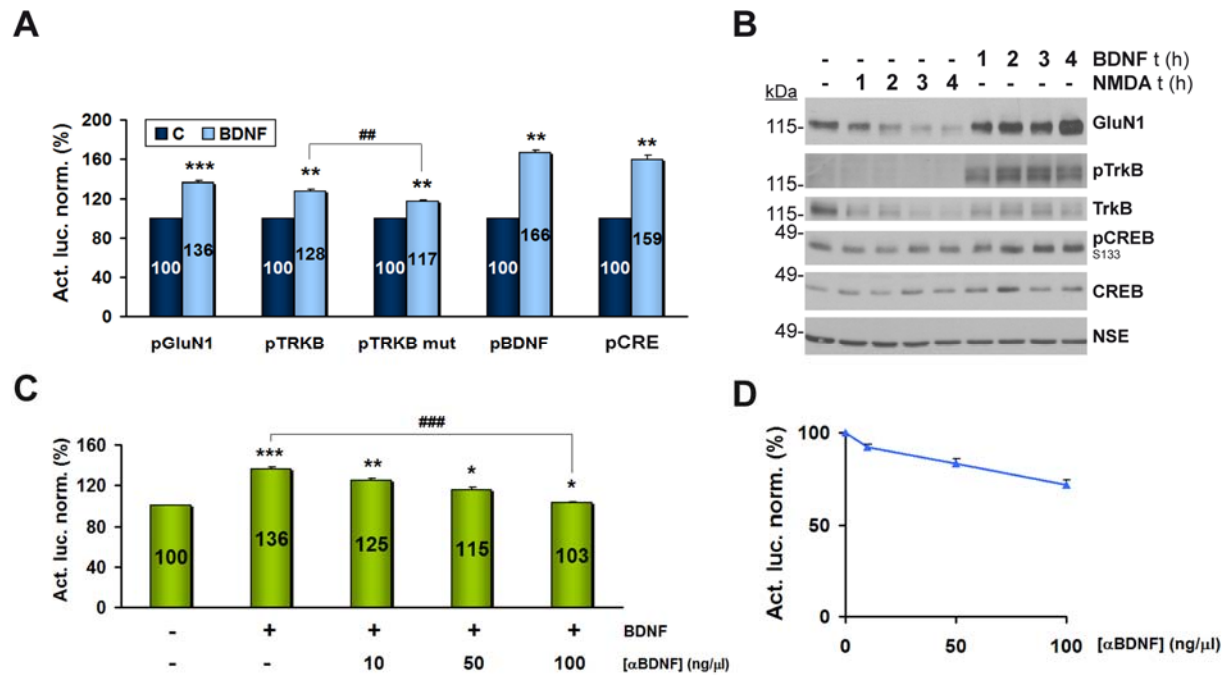


Figura 16. Caracterización de la inducción de la expresión de GluN1 a través de la vía BDNF/TrkB/CREB. A) Estudio del efecto del tratamiento con BDNF sobre la actividad de diversos promotores. Cultivos primarios neuronales (11 DIVs) fueron co-transfectados con pRL-null (0'07 μg) y 0'5 μg de cada uno de los plásmidos pGluN1, pTRKB, pTRKB mut, pBDNF y pCRE. Veinticuatro horas después (12 DIVs), los cultivos se trataron con BDNF (50 ng/ml) durante 90 min. La actividad luciferasa se presenta normalizada respecto a la luciferasa de Renilla y, para cada plásmido, se expresa como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar, al que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada (** $p < 0'01$; *** $p < 0'001$). **B)** Comparación de los efectos de BDNF y NMDA. Cultivos primarios neuronales (14 DIVs) tratados con BDNF (50 ng/ml) o NMDA (100 μM) durante los tiempos indicados, y analizados mediante *immunoblot* con anticuerpos específicos para GluN1, pTrkB, panTrkB, pCREB S133, CREB y, como control, NSE. **C)** Demostración del bloqueo de los efectos del BDNF mediante anticuerpos neutralizantes. Cultivos primarios co-transfectados como anteriormente con pGluN1 y pRL-null fueron tratados a las 24 h de transfección simultáneamente durante 3 h con BDNF (50 ng/ml) y el anticuerpo αBDNF (10, 50 y 100 ng/μl). Se presentan valores medios \pm s.e.m. de actividad luciferasa normalizada de 3 experimentos independientes tratados como anteriormente (* $p < 0'05$; ** $p < 0'01$; *** $p < 0'001$). También se comparan los valores obtenidos en presencia de BDNF con o sin anticuerpo αBDNF (100 ng/μl, ### $p < 0'001$). **D)** Efectos del bloqueo del BDNF endógeno sobre la actividad del promotor *glun1*. Cultivos primarios co-transfectados como anteriormente con pGluN1 y pRL-null fueron tratados a las 24 h de transfección con anticuerpo αBDNF (10, 50, 100 ng/μl) durante 3 h. La actividad luciferasa se presenta normalizada como se indicó y como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo.

Los resultados de las **figuras 16A y 16B** sugerían la posibilidad de que la activación basal de TrkB inducida por neurotrofinas presentes en el medio de cultivo pudiese contribuir a mantener los niveles de GluN1 en los cultivos neuronales sin estimular. Para abordar esta posibilidad, utilizamos un anticuerpo neutralizante de BDNF que, en cultivos primarios neuronales transfectados con pGluN1, fue capaz de bloquear de forma dosis-dependiente el aumento de la actividad promotora inducido por el BDNF (**Fig. 16C**). Así, la adición al medio de cultivo de 100 ng/μl de anticuerpo fue capaz de revertir la actividad luciferasa obtenida en presencia de BDNF (50 ng/ml) desde valores de 136 ± 2 , en ausencia de anticuerpo, hasta un $103 \pm 0'6$ en su presencia (### $p < 0'001$; $n=3$). Una vez demostrado que el anticuerpo de BDNF era capaz de neutralizar la neurotrofina añadida al medio de

cultivo, realizamos un experimento similar para tratar de bloquear la vía BDNF/TrkB endógena en los cultivos sin estimular. Los resultados de actividad luciferasa de un experimento representativo mostraron una disminución importante de la actividad del promotor de *glun1* en función de la dosis de anticuerpo, alcanzándose valores del $71\% \pm 1$ para a la concentración de 100 ng/ μ l (**Fig. 16D**), datos que confirman la presencia de BDNF en los cultivos y su regulación de forma basal del promotor de *glun1*. En conjunto estos experimentos sugieren que la vía BDNF/TrkB/CREB regula la expresión del gen *glun1* en condiciones basales y podría ser un factor determinante en la inhibición de la expresión de GluN1 inducida en condiciones de excitotoxicidad

4.2. Estudio de la implicación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y de inducción por BDNF.

La neurotrofina BDNF induce la activación de la quinasa ERK5 durante el desarrollo embrionario mediante su fosforilación específica por la MAPKK MEK5 (Mody et al., 2003), a través de una cascada de señalización en la que también participan Rap 1 y MEKK2, una quinasa de MEK5 (Wang et al., 2006b). La proteína ERK5 parece tener un papel esencial en la supervivencia neuronal, mediado por la fosforilación de diferentes sustratos que incluyen FTs, como los miembros de la familia MEF2 (Liu et al., 2003; Watson et al., 2001) o CREB (Watson et al., 2001). Por ello, una vez demostrada la participación de BDNF y de elementos de respuesta de tipo MEF2 y CRE en la regulación de la expresión basal de *glun1* en los cultivos primarios neuronales, decidimos caracterizar la posible participación de ERK5 en dicho proceso. Para ello, los cultivos primarios fueron co-transfectados con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, junto con cantidades variables (0'1- 0'3 μ g) de cERK5, un plásmido que contiene el cDNA de ERK5 clonado en pcDNA3 (Kasler et al., 2000). Este último plásmido se usó para igualar la cantidad total de DNA utilizada en todos los ensayos. A medida que incrementamos la dosis de cERK5 aumentó la actividad del promotor de *glun1*, llegando a alcanzarse a las 24 h de transfección valores de actividad luciferasa del $194\% \pm 4$ ($***p<0'001$; n=3), niveles significativamente superiores a los obtenidos para pcDNA3, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100% (**Fig. 17A**). Este resultado indica que el aumento en los niveles de ERK5 en los cultivos primarios activa el promotor proximal de *glun1*.

La regulación de la actividad del promotor de *glun1* por ERK5 demostrada en el experimento anterior podría estar mediada por la activación de FTs MEF2 o CREB. Como una primera aproximación, nos propusimos estudiar el efecto de la expresión de ERK5 sobre los promotores MEF2 y CREB canónicos utilizados anteriormente (**Fig. 17B**). Para ello, co-transfectamos cultivos primarios neuronales con pCRE o pMEF junto con cERK5 (0'3 μ g) de forma similar a lo realizado en el experimento anterior.

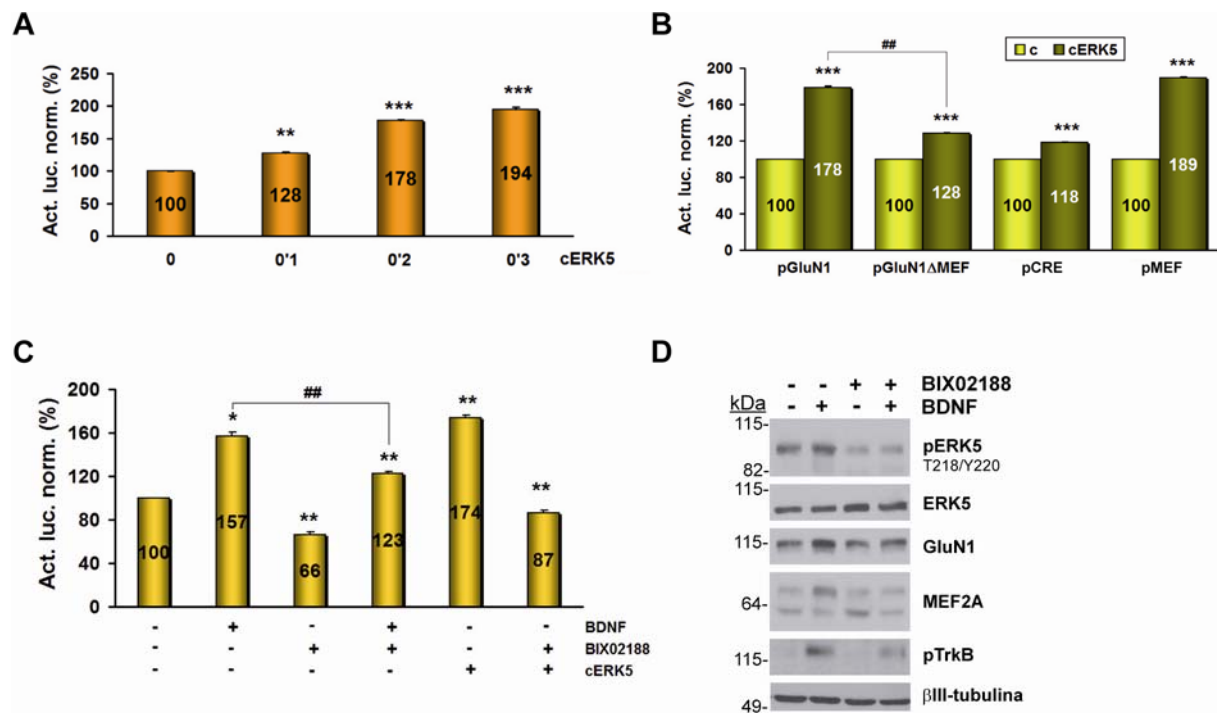


Figura 17. Estudio de la implicación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 mediada por BDNF. **A)** Efecto de la sobre-expresión de ERK5 sobre la actividad basal del promotor *gluN1*. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados durante 24 h como anteriormente con pGluN1 y pRL-null y cantidades variables (0-0.3 μg) del plásmido cERK5, que contiene el cDNA de ERK5. Para igualar la cantidad total de DNA utilizada en todas las transfecciones se utilizó pcDNA3, el vector base utilizado para preparar cERK5. La actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del valor obtenido en las células transfectadas con 0.3 μg de pcDNA3, al que asignamos arbitrariamente un 100%, mostrándose valores medios ± s.e.m. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada ($n=3$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). **B)** Efecto de la sobre-expresión de ERK5 sobre la actividad basal de promotores CRE y MEF2 canónicos. Cultivos primarios neuronales (11 DIVs) fueron co-transfectados durante 24 h con pRL-null (0.07 μg), 0.5 μg de cada uno de los plásmidos pGluN1, pGluN1ΔMEF, pMEF y pCRE, y 0.3 μg de cERK5 o pcDNA3 (c). La actividad luciferasa se presenta normalizada y como porcentaje de los valores obtenidos en las células transfectadas con 0.3 μg de pcDNA3, a los que arbitrariamente asignamos un 100%, mostrándose valores medios ± s.e.m. Los cálculos estadísticos se realizaron como se indicó. ($n=3$; *** $p<0.001$). También se comparan los valores obtenidos en presencia de cERK5 para los plásmidos pGluN1ΔMEF y pGluN1 (** $p<0.01$). **C)** Efecto de la inhibición de ERK5 en la actividad basal del promotor *gluN1* y su respuesta a BDNF. Cultivos primarios (11 DIVs) fueron co-transfectados durante 24 h con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, y 0.3 μg de cERK5 o pcDNA3. Seguidamente, los cultivos indicados se trataron con BIX02188 (10 μM) durante 30 min y posteriormente con BDNF (50 ng/ml) durante 1 h. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar y transfectadas con pcDNA3 (valor arbitrario del 100%), mostrándose los valores medios ± s.e.m. Los cálculos estadísticos se realizaron como se indicó. ($n=3$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$). También se comparan los valores de actividad luciferasa de los cultivos transfectados con pGluN1 y tratados con BDNF, pre-incubados o no con BIX02188 (** $p<0.01$). **D)** Efectos de la inhibición de ERK5 en la expresión basal de GluN1 y su respuesta a BDNF. Cultivos primarios neuronales (14 DIVs) pre-tratados con BIX02188 (10 μM) durante 30 min y posteriormente tratados o no con BDNF (50 ng/ml) durante 3 h, analizados mediante *immunoblot* con los anticuerpos específicos para pERK5 T218/Y220, ERK5, GluN1, MEF2A, pTrkB y βIII-tubulina.

Observamos que la actividad luciferasa normalizada obtenida para un promotor MEF2 canónico aumentaba fuertemente y de manera significativa con la expresión exógena de ERK5, alcanzándose valores del $189\% \pm 1$ (** $p<0.001$; $n=3$) respecto a los de los cultivos transfectados con pcDNA3. En el caso del promotor CRE, la expresión de ERK5 produjo un aumento mucho menor de la actividad

promotora ($118\% \pm 0'6$; $***p<0'001$; $n=3$). A continuación, comparamos el efecto de ERK5 sobre la actividad del promotor *glun1* salvaje y el doble mutante de delección MEF2 (pGluN1 Δ MEF) (**Fig. 17B**). Los resultados mostraron que la delección de las secuencias -812/-789 y -2363/-2341 del promotor proximal de *glun1* reducía considerablemente el efecto de ERK5, alcanzándose valores del $128\% \pm 0'9$, bastante inferiores que los observados para el promotor salvaje ($178\% \pm 2$; $^{##}p<0'01$) aunque similares a los de pCRE. Por tanto, podemos concluir que la regulación del promotor de *glun1* por ERK5 está mediada mayoritariamente por elementos MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341). Adicionalmente, a falta de realizar un análisis similar sobre el doble mutante de delección CRE (pGluN1 Δ CRE), los resultados sugieren un papel menor de los elementos CRE en la regulación del promotor de *glun1* por ERK5.

Seguidamente quisimos establecer si la quinasa ERK5 presente de forma endógena en los cultivos primarios participa en la expresión basal de GluN1 y en su inducción por la adición de BDNF (**Fig. 17C y 17D**). Recientemente, gracias al desarrollo de los inhibidores específicos de MEK5, BIX02188 y BIX02189 (Tatake et al., 2008), es posible bloquear la activación de ERK5 y establecer de forma inequívoca las funciones de esta quinasa en la fisiología neuronal en contraposición con las de otras MAPKs. En primer lugar realizamos ensayos de actividad del promotor de *glun1* en cultivos transfectados con pGluN1 y pRL-null, tratados con BDNF (50 ng/ml) durante 1 h tras su pre-tratamiento o no con BIX02188 (10 μ M) durante 30 min (**Fig. 17C**). La actividad luciferasa inducida de forma basal por transfección de pGluN1 disminuyó hasta el $66\% \pm 3$ ($**p<0'01$; $n=3$) en presencia del inhibidor de ERK5 en comparación con la de cultivos sin tratar. Además, BIX02188 fue también capaz de inhibir parcialmente la activación de este promotor inducida por BDNF, siendo los valores de actividad luciferasa respectivamente del $123\% \pm 2$ y $157\% \pm 4$ para las células tratadas con BDNF + BIX02188 o sólo BDNF ($^{##}p<0'01$). Confirmamos la eficacia y especificidad de este inhibidor mediante el análisis de cultivos en los que de nuevo co-transfectamos pGluN1 y pRL-null con cERK5 y que fueron tratados o no con BIX02188 (**Fig. 17C**). Una vez caracterizados sus efectos sobre la actividad del promotor *glun1*, quisimos analizar las consecuencias del tratamiento con BDNF y BIX02188 sobre los niveles de la proteína GluN1 y la actividad de ERK5 y MEF2A (**Fig. 17D**). Para ello, cultivos primarios neuronales de 14 DIVs pre-tratados 30 min con BIX02188 fueron seguidamente incubados con BDNF durante 3 h y analizados mediante *immunoblot*. En presencia de BDNF observamos una fuerte activación de TrkB así como un claro aumento de la actividad de ERK5, establecida mediante un fosfo-anticuerpo específico que reconoce los residuos de Thr218 y Tyr220 fosforilados por MEK5 (pERK5), mientras que los niveles de proteína total ERK5 no sufrieron grandes cambios. El tratamiento con BDNF también indujo un incremento de los niveles de GluN1 respecto a los de cultivos control y, en el caso de MEF2A, un aumento de los niveles de una forma de esta proteína de menor movilidad electroforética que podría corresponder a una forma fosforilada y activa del FT, y

Resultados

una disminución de los niveles de la proteína de mayor movilidad que podría corresponder a la proteína inactiva (**Fig. 17D**). Por último, en presencia de BIX02188 se produjo una disminución importante en los niveles de pERK5 en comparación con los cultivos sin tratar y el bloqueo de su activación por BDNF. La inhibición de ERK5 previno completamente la inducción por BDNF de la expresión de GluN1 y los cambios previamente observados en los niveles relativos de las dos formas de MEF2A. En conjunto, estos resultados y los de experimentos anteriores permiten concluir que GluN1 se regula en condiciones basales por un mecanismo que implica la vía BDNF/TrkB/ERK5, que es fuertemente activada por la adición de BDNF exógeno y está mediada por elementos de regulación en *cis* de la familia MEF2 y, en menor medida, CRE de su promotor. Además, estos resultados también sugieren que MEF2A podría ser un sustrato de ERK5 y que esta quinasa sería responsable de su activación en presencia de BDNF.

4.3. Estudio de la implicación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad.

Una vez demostrada la participación de ERK5 en la regulación de la expresión basal de GluN1, nos propusimos estudiar si esta quinasa tenía importancia en la regulación del gen *glun1* en condiciones de excitotoxicidad. En la literatura existe cierta controversia sobre la activación o no de esta quinasa en modelos de isquemia/reperfusión (Wang et al., 2004) (Wang et al., 2006a). Sin embargo, una entrada moderada de Ca^{2+} a través de los NMDARs en modelos de pre-condicionamiento isquémico induce la activación de manera persistente de ERK5 (Wang et al., 2006a), que participa en la activación de MEF2C y desempeña un papel fundamental en las acciones anti-apoptóticas y neuroprotectoras del pre-condicionamiento (Wang et al., 2009).

Utilizando ensayos similares a los mostrados en las **Figs. 17A y 17B**, comparamos el efecto del tratamiento con NMDA (2 h) sobre la actividad de diferentes promotores en cultivos primarios que sobre-expresaban o no ERK5 (**Figs. 18A y 18B**). La actividad luciferasa normalizada obtenida para pGluN1 en condiciones de excitotoxicidad se incrementó significativamente al aumentar la cantidad de plásmido cERK5, llegando a ser de un $146\% \pm 1$ a la dosis de $0.3 \mu\text{g}$, valor notablemente superior al obtenido en las células transfectadas de igual manera con el plásmido control pcDNA3 ($47\% \pm 0.8$; $^{###}p < 0.001$; $n=3$) (**Fig. 18A**). Además, la diferencia entre la actividad promotora de *glun1* en las condiciones control y de excitotoxicidad fue mucho menor a medida que aumentábamos la dosis de ERK5, manteniéndose un $75\% \pm 1$ de la actividad luciferasa en el caso de la concentración máxima de cERK5 en comparación con el $47\% \pm 1$ ($^{***}p < 0.001$) de las células que no expresan ERK5 exógena (**Fig. 18A**). Estos resultados demuestran que un aumento en los niveles de la quinasa ERK5 ejerce un efecto protector sobre la inhibición de la actividad del promotor de *glun1* inducida en condiciones de

excitotoxicidad. Además, los datos anteriores sugieren que la pérdida de la proteína ERK5 y/o su actividad enzimática inducidas por la sobreactivación del NMDAR podrían ser un factor importante en la inhibición de la transcripción del gen *glun1*.

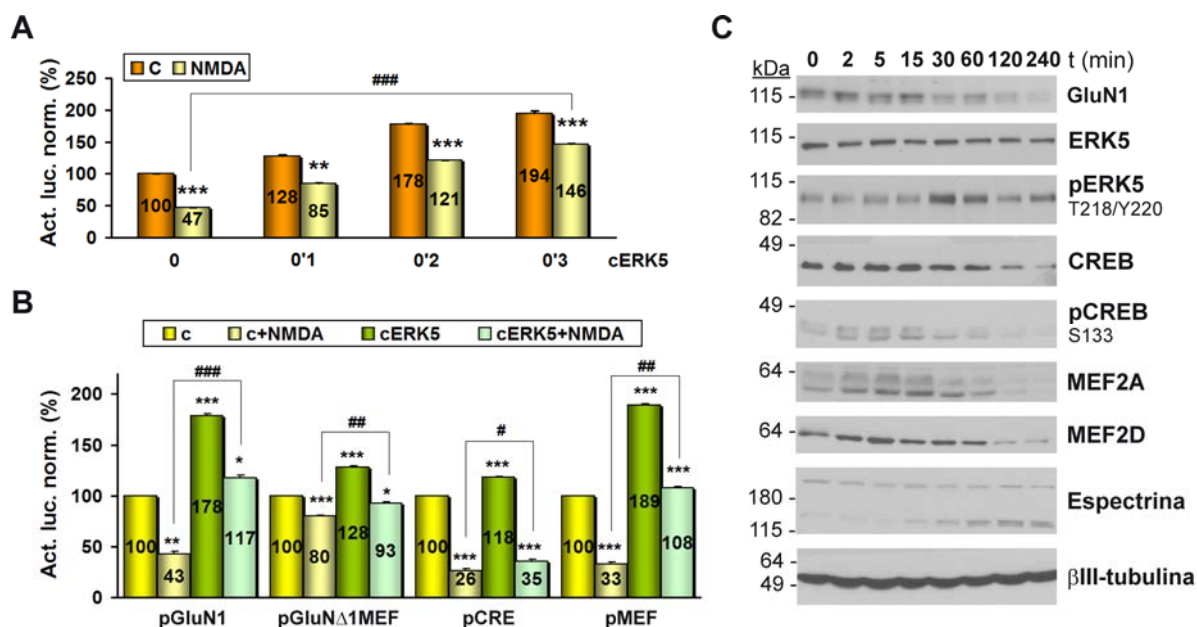


Figura 18. Estudio de la participación de ERK5 en la regulación de la expresión de GluN1 en excitotoxicidad. **A)** Efecto de la sobre-expresión de ERK5 sobre la regulación del promotor *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados durante 24 h como anteriormente con pGluN1 y pRL-null, y cantidades variables (0-0'3 µg) de cERK5 o pcDNA3, siendo la cantidad total de estos dos últimos plásmidos siempre igual a 0'3 µg. Seguidamente los cultivos fueron tratados con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del resultado obtenido en las células transfectadas con 0'3 µg de pcDNA3 tratadas con NMDA, a las que se les dio un valor arbitrario de 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student despareada (** $p < 0'01$; *** $p < 0'001$). También se compara la actividad luciferasa obtenida en células tratadas con NMDA en presencia de 0'3 µg de cERK5 o pcDNA3 (*** $p < 0'001$). **B)** Efecto de la sobre-expresión de ERK5 sobre la regulación de promotores CRE y MEF2 canónicos en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados a 11 DIVs durante 24 h con pRL-null (0'07 µg), 0'5 µg de cada uno de los plásmidos pGluN1, pGluN1ΔMEF, pMEF y pCRE, y 0'3 µg de cERK5 o pcDNA3 (c). Seguidamente los cultivos se trataron con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa se presenta normalizada y, para cada promotor, como porcentaje del valor obtenido en las células transfectadas con 0'3 µg de pcDNA3 sin tratar con NMDA (valor arbitrario de 100%). Se muestran valores medios \pm s.e.m. Los cálculos estadísticos se realizaron como se indicó (n=3; * $p < 0'05$; ** $p < 0'01$; *** $p < 0'001$). En todos los casos, también se compara la actividad luciferasa obtenida en presencia de NMDA en presencia de 0'3 µg cERK5 o pcDNA3 (* $p < 0'05$; ** $p < 0'01$; *** $p < 0'001$). **C)** Análisis mediante inmunoblot de la cinética de regulación de pERK5 inducida por NMDA. Cultivos primarios (14 DIVs) tratados con NMDA durante 2-240 min fueron analizados utilizando los anticuerpos específicos para GluN1, ERK5, pERK5 T218/Y220, CREB, pCREB S133, MEF2A, MEF2D, espectrina y βIII-tubulina.

Puesto que la regulación del promotor de *glun1* por ERK5 en los cultivos no tratados con NMDA estaba mediada por elementos MEF2 y en menor medida CRE (Fig. 17B), seguidamente nos propusimos analizar el papel de estos mismos motivos en la regulación de *glun1* inducida en condiciones de excitotoxicidad (Fig. 18B). En el caso del promotor CRE canónico, si bien observábamos un pequeño aumento en la actividad luciferasa obtenida en condiciones de excitotoxicidad cuando se incrementaban los niveles de ERK5 ($35\% \pm 2$ frente al $26\% \pm 2$ de los

Resultados

cultivos transfectados con pcDNA3, [#] $p < 0.05$; $n=3$), el porcentaje de reducción de la actividad promotora inducido por el NMDA era muy similar en los cultivos que sobre-expresaban ERK5 o no (respectivamente 29% y 26%). Por el contrario, la actividad promotora reinducida por pMEF en los cultivos tratados con NMDA se recuperó en gran medida al sobre-expresar ERK5 ($108\% \pm 1$ versus $33\% \pm 2$ para las células transfectadas con pcDNA3, ^{##} $p < 0.01$, y un 57% de actividad luciferasa remanente frente al 33%). El resultado obtenido para pMEF concordaba con el de pGluN1, lo que sugería una gran importancia de los sitios MEF2 en la regulación del promotor de *glun1* por ERK5 en condiciones de excitotoxicidad, de forma similar a como ocurría en condiciones basales. El análisis del promotor mutante pGluN1 Δ MEF confirmó esta hipótesis ya que ahora la sobre-expresión de ERK5 solo fue capaz de producir una pequeña recuperación de la actividad luciferasa ($93\% \pm 1$ versus $80\% \pm 0.3$ para las células transfectadas con pcDNA3, ^{##} $p < 0.01$, y un 73% de actividad luciferasa remanente frente al 80%) (**Fig. 18B**). En conjunto, estos experimentos demuestran que la regulación del promotor *glun1* en excitotoxicidad por ERK5 esta mediada principalmente a través de los sitios MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341), siendo la contribución de las secuencias CRE minoritaria.

Caracterizamos a continuación como se veían afectados los niveles de proteína ERK5 y su actividad enzimática a consecuencia de la sobreactivación del NMDAR (**Fig. 18C**). Para ello, cultivos primarios *neuronaes* de 14 DIVs fueron tratados con NMDA tal como se indicó anteriormente durante tiempos variables (2-240 min) y, seguidamente, los extractos se analizaron mediante *immunoblot*. El análisis de pERK5 mostró la activación rápida y transitoria de esta quinasa, que se inició a los 5 min de tratamiento y alcanzó un máximo a los 30 min, recuperándose los niveles basales de pERK5 a los 120 min. Los niveles totales de esta proteína se mantuvieron constantes a lo largo del tratamiento con NMDA. De forma análoga a lo que ocurría tras la estimulación con BDNF (**Fig. 17D**), el tratamiento con NMDA dio lugar a la acumulación transitoria de la forma de MEF2A que creemos pudiera corresponder a la proteína activa. No observamos cambios en los niveles o movilidad de la proteína MEF2D hasta los 120 min momento en el que, al igual que para MEF2A, éstos comenzaron a disminuir. En el caso de pCREB pudimos confirmar el rápido *shut-off* descrito anteriormente para la activación de esta proteína en condiciones de excitotoxicidad (Hardingham et al., 2002) y una disminución de los niveles totales de CREB a partir de los 120 min. En el contexto de las proteínas analizadas, observamos que la subunidad GluN1 se regulaba negativa y progresivamente desde tiempos tempranos de tratamiento (a partir de los 15 min), estando sus niveles muy reducidos a las 4 h de tratamiento con NMDA, como se demostró (Gascon et al., 2005). La disminución de los niveles de CREB, MEF2A y MEF2D a tiempos prolongados de tratamiento con NMDA podría deberse a la activación de la proteasa calpaína, efector crítico en la excitotoxicidad neuronal (Hong et al., 1994a; Siman and Noszek, 1988). Para empezar a analizar esta hipótesis caracterizamos la espectrina cerebral (**Fig. 18C**), un sustrato bien establecido de la calpaína cuyo procesamiento y generación de

fragmentos estables de 150 y 145 kDa está ampliamente aceptado como marcador de su actividad. Confirmamos la activación de esta proteasa desde tiempos muy tempranos del tratamiento con NMDA (15 min), mucho antes de la disminución de las proteínas mencionada anteriormente. El tratamiento con NMDA no tuvo sin embargo un efecto significativo sobre los niveles de otras proteínas neuronales, como la β III-tubulina, confirmando que la regulación de CREB, MEF2A y MEF2D en condiciones excitotóxicas es específica y no consecuencia de un proceso generalizado de muerte neuronal.

En conjunto, estos experimentos permiten concluir que ERK5 tiene un papel central en la regulación de *glun1* tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad mediado principalmente por los sitios MEF2 en las posiciones -812/-789 y -2363/-2341, y que esta quinasa sufre un proceso de inactivación similar al descrito anteriormente para pCREB que podría ser una causa de la pérdida de actividad de los FTs de la familia MEF2.

5. Regulación de la actividad de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D en condiciones basales y de excitotoxicidad y su efecto sobre la expresión de GluN1.

5.1. Estudio de la participación de la Ser/Thr fosfatasa PP1 en la regulación de ERK5, CREB, MEF2A y MEF2D.

Un mecanismo muy frecuente de regulación de la función de FTs es mediante el control de su estado de fosforilación, que podría verse modificado por la activación de diversas quinasas y fosfatasas tal como ocurre durante el proceso de excitotoxicidad. Como hemos demostrado, uno de los FTs que regulan la expresión de GluN1 en excitotoxicidad es CREB, cuya inactivación o *shut-off* fue confirmada en nuestro modelo experimental (**Fig. 18C**). En el mecanismo de inactivación de pCREB en excitotoxicidad es importante la defosforilación de su residuo Ser133 mediada por PP1 (Sala et al., 2000), Ser/Thr proteína fosfatasa que se activa en excitotoxicidad y tiene multitud de sustratos (Gee and Mansuy, 2005). Por tanto, nos propusimos estudiar si esta proteína fosfatasa estaba implicada en la represión de GluN1 a través de la defosforilación de pCREB o de otras proteínas reguladoras como pERK5, que también resultaba inactivada en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 18C**). En una primera aproximación decidimos utilizar ácido okadaico (AO), un compuesto que a baja concentración (2 nM) inhibe la fosfatasa PP2A pero que utilizado a alta concentración (1 μ M) bloquea además la función de PP1. Por tanto, tratamos cultivos primarios de 14 DIVs con ambas concentraciones de AO para averiguar si alguna de estas fosfatasas estaba implicada en la regulación de GluN1. Tras un pre-tratamiento con AO durante 30 min, los cultivos fueron incubados o no con NMDA durante 4 h. El análisis por *immunoblot* (**Fig. 19A**) mostró que, en los cultivos incubados con

Resultados

NMDA, había un efecto importante sobre los niveles de GluN1 del AO a la dosis de 1 μ M respecto a los de cultivos sin tratar o tratados con la concentración de 2 nM. Estos resultados sugieren la participación de la fosfatasa PP1 en la regulación de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad, mientras que descartan la de PP2A. Como cabía esperar, la inhibición de PP1 dio lugar a la hiperfosforilación de CREB y la disminución de su movilidad electroforética, no ocurriendo así al inhibir PP2A. Además, las formas hiperfosforiladas de CREB presentaban mayor estabilidad en condiciones de excitotoxicidad, sugiriendo que la disminución en los niveles de este FT inducida por la sobreactivación prolongada de los NMDARs descrita anteriormente (**Fig. 18C**) dependía de su estado de fosforilación, determinado por las actividades relativas de la fosfatasa PP1 y una/s quinasa/s por determinar. La fosfatasa PP1, y no PP2A, también participaba en la defosforilación de pERK5 en condiciones basales y su inhibición daba lugar a un aumento en los niveles de fosforilación de esta quinasa y la aparición de numerosas bandas de menor movilidad electroforética que probablemente corresponden a formas hiperfosforiladas de ERK5. Resulta muy interesante el notable aumento en los niveles totales de ERK5 observado en los cultivos incubados con AO 1 μ M independientemente de su tratamiento o no con NMDA, resultado que sugiere la existencia de algún mecanismo de regulación de la síntesis o degradación de esta proteína dependiente de la actividad de PP1. No se observaron cambios importantes en los niveles de β III-tubulina, utilizada como control. Los resultados anteriores sugieren que la participación de la fosfatasa PP1 en la regulación de GluN1 observada en condiciones de excitotoxicidad podría estar mediada a través de la defosforilación e inactivación de pERK5 y pCREB.

Una vez demostrada la participación de la fosfatasa PP1 en la regulación de GluN1, nos propusimos hacer un estudio más detallado de las consecuencias de su inhibición prolongada (**Fig. 19B**). Para ello, los cultivos primarios fueron tratados con AO (1 μ M) durante distintos tiempos (5-120 min). Observamos que los niveles de la subunidad GluN1 aumentaban ligeramente a medida que avanzaba el tiempo de tratamiento con AO hasta los 30 min, cuando se obtuvieron los niveles máximos (**Fig. 19B**). El análisis de las proteínas pCREB y pERK5 mostró su activación desde tiempos muy tempranos de la inhibición de PP1, probablemente debido a la actividad endógenas de las quinasas responsables de su fosforilación, y la acumulación progresiva de sus formas hiperfosforiladas. Adicionalmente, en el caso de ERK5, la inhibición de PP1 dio lugar a un aumento muy marcado de los niveles totales de esta quinasa desde tiempos muy tempranos del tratamiento con AO. Este resultado sugiere como poco probable que la PP1 tenga un efecto sobre la síntesis de esta quinasa y apoya más bien la existencia de algún mecanismo de tipo degradativo que sería muy activo de forma basal, actuando fundamentalmente sobre la proteína no fosforilada.

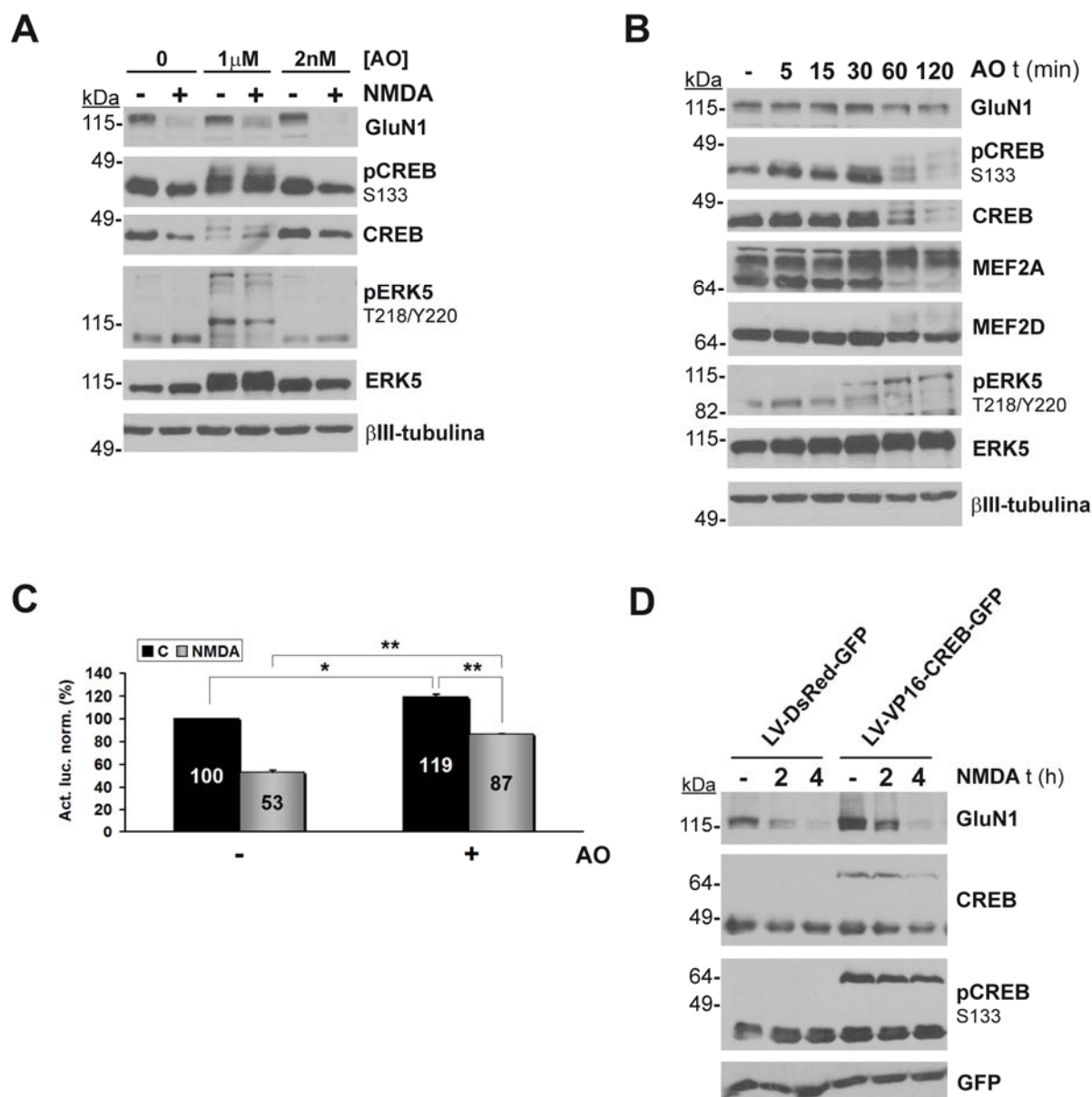


Figura 19. Caracterización de la participación de la fosfatasa PP1 en la regulación de GluN1 en excitotoxicidad a través de la defosforilación de ERK5, CREB y MEF2. **A)** Análisis mediante *immunoblot* de la regulación de GluN1 inducida por AO y NMDA. Los cultivos se pre-trataron con AO a dos concentraciones (1 μ M, inhibe PP1 y PP2A, y 2 nM, inhibe sólo a PP2A) durante 30 min y posteriormente se trataron o no con NMDA durante 4 h. Los niveles de proteína se establecieron utilizando los anticuerpos específicos para GluN1, ERK5, pERK5 T218/Y220, CREB, pCREB S133 y β III-tubulina. **B)** Análisis mediante *immunoblot* del efecto de la inhibición prolongada de la fosfatasa PP1 sobre GluN1 y otras proteínas. Los cultivos se trataron con AO (1 μ M) durante distintos tiempos (0-120 min) y los niveles de proteína se establecieron utilizando los anticuerpos anteriores y los de MEF2A y MEF2D. **C)** Efecto de la inhibición de PP1 sobre la actividad del promotor *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados a 11 DIVs con pGluN1 y pRL-null como anteriormente y, 24 h después, pre-tratados con AO (1 μ M) durante 1 h y posteriormente tratados con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar, al que se le dio un valor arbitrario de 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos significativos y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **D)** Efecto de la expresión neuroespecífica de una forma constitutivamente activa de CREB en la regulación de GluN1. Los cultivos primarios fueron infectados a 10 DIVs con LV-VP16-CREB-GFP o LV-DsRed-GFP (MOI=1) durante 4 días y tratados con NMDA durante 2 ó 4 h. Los extractos preparados fueron analizados mediante *immunoblot* con anticuerpos específicos para GluN1, CREB, pCREB S133 y GFP.

Resultados

El análisis de MEF2A en los cultivos tratados con AO mostró cambios con una cinética similar a la de pCREB y pERK5, concretamente una disminución drástica de los niveles de la proteína de mayor movilidad electroforética a partir de los 30 min de tratamiento y un aumento progresivo de la forma de menor movilidad, que correspondería al FT fosforilado y activo. El análisis de MEF2D mostraba la aparición a partir de los 30 min de tratamiento de pequeños niveles de formas de esta proteína de menor movilidad electroforética que podrían corresponder a FT fosforilado y activo (**Fig. 19B**). Sin embargo, estos cambios no fueron experimentados por la proteína β III-tubulina usada como control. Estos resultados permiten concluir que pCREB, pERK5, pMEF2A y pMEF2D son todas ellas proteínas defosforiladas en condiciones basales por acción de la PP1 y siguen una cinética muy similar de activación tras la inhibición de esta fosfatasa, sugiriendo que podrían estar participando en una misma vía de señalización importante para la regulación basal de GluN1.

A continuación, nos propusimos analizar el efecto de la inhibición de PP1 sobre la actividad del promotor del gen *glun1* en los cultivos primarios neuronales, tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. Para ello co-transfectamos los cultivos con pGluN1 y pRL-null como anteriormente, y pre-tratamos las células transfectadas con AO (1 μ M) durante 1 h previamente a la inducción del proceso de excitotoxicidad con NMDA durante 2 h (**Fig. 19C**). Como podemos observar, confirmamos la regulación negativa ejercida por PP1 en condiciones basales sobre el promotor de *glun1* ya que, en presencia de AO, la actividad luciferasa de pGluN1 aumentaba hasta un $119\% \pm 3$ en comparación con la de células control sin tratar, a la que arbitrariamente dimos un valor del 100 % (* $p < 0.05$; $n=3$). Esta fosfatasa también participaba en la inhibición de la función de este promotor en excitotoxicidad, y su actividad se recuperaba en gran medida en presencia de AO y NMDA respecto a los cultivos tratados sólo con NMDA ($87\% \pm 0.7$ versus $53\% \pm 2$; ** $p < 0.01$; $n=3$). Sin embargo, el tratamiento con NMDA siguió bloqueando de forma significativa la actividad del promotor de *glun1* incluso en presencia de AO ($87\% \pm 0.7$ versus $119\% \pm 3$; ** $p < 0.01$; $n=3$). En conjunto, los análisis de niveles de GluN1 y de actividad del promotor de *glun1* muestran que la fosfatasa PP1 participa en la inhibición de la expresión de este gen tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad, probablemente mediante la inactivación de los FTs CREB y MEF2, aunque existen otros mecanismos independientes de la actividad de esta fosfatasa.

Por último, ya que la inactivación de pCREB era un mecanismo de regulación de GluN1 en excitotoxicidad, nos propusimos analizar el efecto de la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa de CREB en dicha regulación. Para ello, utilizamos el vector lentiviral dual LV-VP16-CREB-GFP ((Lopez-Menendez et al., 2009), resultados sin publicar), que mediante la utilización del promotor del gen humano de la sinapsina I dirige de manera neuroespecífica la expresión de GFP y una proteína de fusión VP16-CREB, una forma constitutivamente activa de este FT (Barco et al., 2002). Como control utilizamos el lentivirus LV-DsRed-GFP, que dirige la expresión de

las proteínas fluorescentes DsRed y GFP también de forma neuroespecífica (Gascon et al., 2008). Los cultivos primarios (10 DIVs) fueron infectados con ambos virus utilizando la misma multiplicidad de infección (MOI=1) y, tras 4 días de infección, fueron tratados con NMDA durante 2 y 4 h (**Fig. 19D**). El análisis mediante *immunoblot* mostró que, en condiciones basales, los niveles de GluN1 aumentaban en las neuronas infectadas con LV-VP16-CREB-GFP en comparación con las infectadas con el virus control. Además, a tiempos tempranos del tratamiento con NMDA (2 h), los niveles de GluN1 también se mantuvieron más elevados en las células que expresaban esta forma de CREB constitutivamente activa. Sin embargo, a las 4 h de tratamiento los niveles de GluN1 eran iguales en las neuronas infectadas con ambos virus. Una posible explicación sería la progresiva disminución de los niveles de CREB observada anteriormente en tratamientos prolongados con NMDA (**Fig. 18C**). En efecto, el análisis de los niveles totales de CREB mostró una notable disminución en los niveles endógenos de este FT así como en los de la proteína recombinante VP16-CREB (**Fig. 19D**). La proteína GFP, expresada por ambos lentivirus, no sufrió cambios significativos y permitió confirmar que las infecciones se habían realizado en iguales condiciones. Por tanto, podemos concluir que la fosforilación de CREB no es el único mecanismo por el que se regula la actividad de este FT, que también es procesado por alguna/s proteasa/s por establecer, motivo por el que sólo es posible recuperar parcialmente los niveles de GluN1 en fases tempranas del proceso excitotóxico inducido en neuronas que expresan una forma de CREB constitutivamente activa.

5.2. Análisis de la participación de la proteasa calpaína en la regulación de la expresión de GluN1 a través de los factores de transcripción CREB y MEF2.

Los resultados anteriores sugerían que CREB, MEF2A y MEF2D podrían ser sustratos de alguna proteasa tras la sobreactivación del NMDAR (**Fig. 18C**), situación en la que se producía la activación de la calpaína. Esta cisteín proteasa es activada en respuesta a la entrada de calcio en las células y, como mencionamos anteriormente, actúa como un efector crítico en procesos de excitotoxicidad e isquemia cerebral (Hong et al., 1994b; Siman and Noszek, 1988) a través del procesamiento de distintos sustratos (Vosler et al., 2008). De ser cierta esta hipótesis, la proteólisis de estos FTs sería un mecanismo de control de la expresión de *glun1*, y otros genes, junto con la regulación de su actividad por fosforilación. Para abordar este estudio, analizamos los niveles de subunidad GluN1 en cultivos neuronales tratados con inhibidores específicos de esta proteasa, el inhibidor III (CiIII) y calpeptina (Clp), utilizados en combinación para mejorar su eficacia. Los cultivos primarios fueron pre-tratados durante 1 h con CiIII (10 μ M) y Clp (10 μ M), seguido del tratamiento con NMDA durante 4 h (**Fig. 20A**). En estas condiciones, el procesamiento de espectrina, utilizado igual que

Resultados

anteriormente como marcador de la actividad de esta proteasa, fue prácticamente bloqueado por los inhibidores.

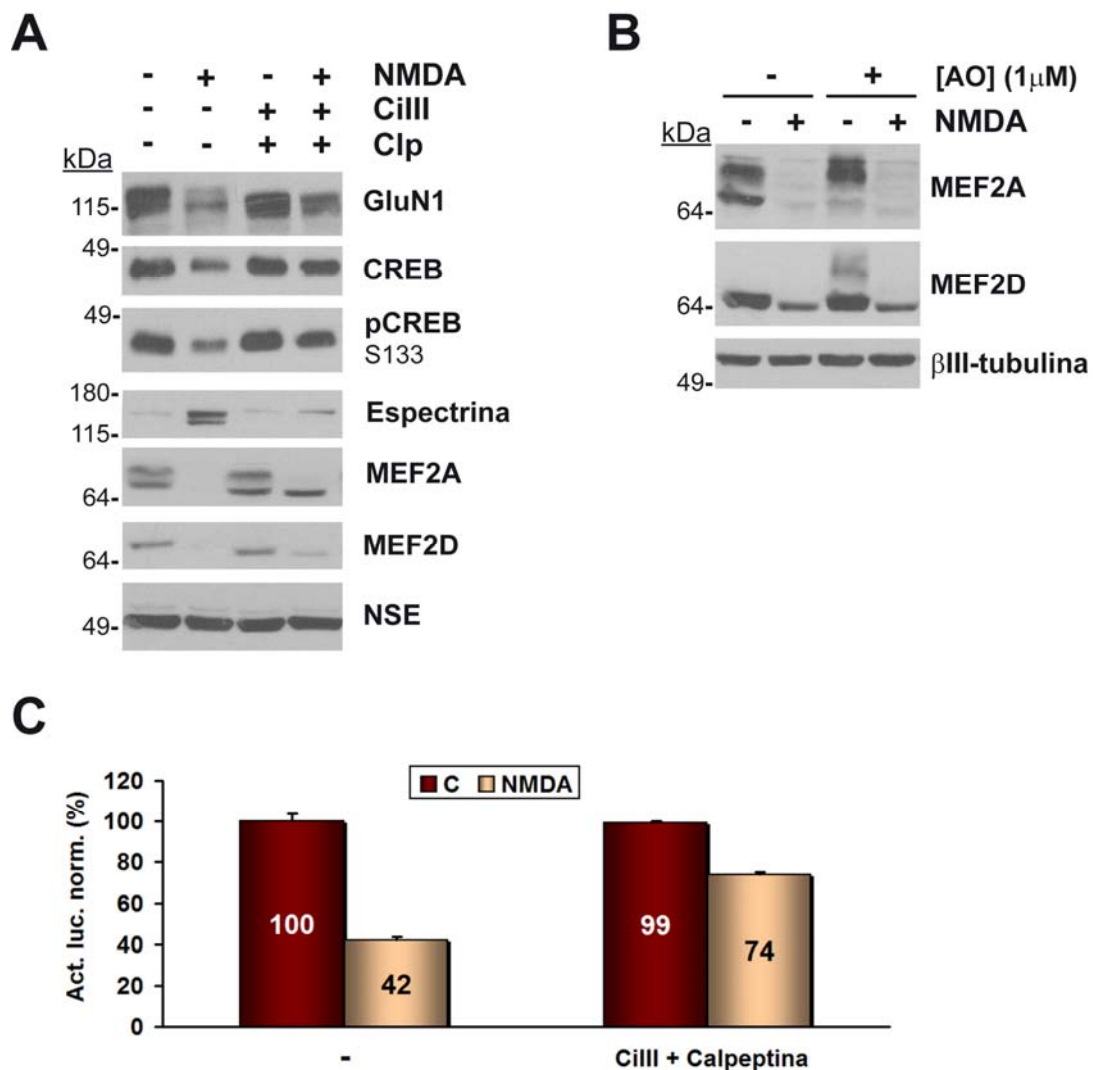


Figura 20. Análisis de la participación de la proteasa calpaína en la regulación de GluN1 a través del procesamiento de CREB y MEF2. **A)** Efecto del tratamiento con inhibidores de calpaína sobre la regulación de GluN1 en excitotoxicidad. Los cultivos primarios de 14 DIVs fueron preincubados, según se indica, con CiIII (10 μ M) y Clp (10 μ M) de manera combinada durante 1 h. Posteriormente se añadió NMDA durante 4 h, manteniéndose los inhibidores de calpaína durante todo el experimento. Se analizaron por *immunoblot* la subunidad GluN1, espectrina, NSE y los FTs CREB, pCREB S133, MEF2A y MEF2D. **B)** Efecto de la inhibición de PP1 sobre la regulación de MEF2 en excitotoxicidad. Los cultivos primarios se pre-trataron con AO 1 μ M durante 30 min y, posteriormente, fueron tratados con NMDA durante 4 h. El análisis por *immunoblot* fue realizado con los anticuerpos específicos para MEF2A y MEF2D, y como control usamos β III-tubulina. **C)** Efecto del tratamiento con inhibidores de calpaína sobre la regulación del promotor *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados a 11 DIVs con pGluN1 y pRL-null como anteriormente y, 24 h después, se pre-trataron durante 1 h con CiIII (10 μ M) y Clp (10 μ M), de manera combinada, y posteriormente se trataron con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar, al que se le dio un valor arbitrario del 100%, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo.

Los resultados del *immunoblot* también mostraban que la calpaína participa en la regulación de la proteína GluN1 en condiciones de excitotoxicidad ya que, en presencia de sus inhibidores específicos, se recuperaban parcialmente sus niveles. Esta recuperación podría explicarse por los resultados obtenidos para CREB, ya que sus niveles igualmente se recuperaron de forma parcial al inhibir a la calpaína en las condiciones de excitotoxicidad. Un resultado muy interesante es la participación de calpaína en la regulación de los FTs MEF2A y MEF2D que ocurre en excitotoxicidad. En presencia de CiIII y Clp tuvo lugar una recuperación casi en su totalidad de los niveles de la forma no fosforilada de MEF2A, no así de las formas fosforiladas, así como una recuperación parcial de MEF2D (**Fig. 20A**). La participación de la calpaína en la regulación de las actividades de los FTs MEF2A y MEF2D asociada al proceso de excitotoxicidad no había sido descrita anteriormente, a excepción de un trabajo muy reciente que muestra el procesamiento de MEF2D (Wei et al., 2012). Los resultados anteriores parecían sugerir que, en condiciones de excitotoxicidad, la regulación de los niveles de los FTs MEF2A era dependiente de su estado de fosforilación o bien que esta proteína es altamente susceptible a defosforilación. Para analizar esta posibilidad, los cultivos neuronales fueron pre-tratados durante 30 min con AO (1 μ M) y, tras la inhibición de PP1, tratados con NMDA durante 4 h (**Fig. 20B**). Observamos que, a diferencia de los resultados anteriores para CREB (**Fig. 19A**), los niveles de ambas proteínas MEF2 se reducían por igual en presencia de NMDA, independientemente de sus niveles de fosforilación. Sin embargo, en el caso de MEF2A, el tratamiento con NMDA en presencia de los inhibidores de calpaína (**Fig. 20A**) sólo permitió la recuperación de la forma no fosforilada de MEF2A ya que, debido a la activación de PP1 asociada al proceso de excitotoxicidad, ésta sería la forma de MEF2A mayoritaria en esas condiciones. En conjunto, podemos concluir que la activación de la calpaína en condiciones de excitotoxicidad participa en el bloqueo de la expresión de GluN1, posiblemente a través del procesamiento de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D.

Por último, analizamos si la actividad del promotor de GluN1 se veía afectada por la activación de calpaína (**Fig. 20C**). Para ello, hicimos co-transfecciones en cultivos primarios neuronales con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente. A continuación, los cultivos fueron pre-tratados durante 1 h con CiIII y Clp (ambos a 10 μ M) y posteriormente tratados con NMDA durante 2 h. Como podemos observar en el histograma correspondiente a un experimento representativo, la actividad luciferasa obtenida en condiciones de excitotoxicidad y en presencia de los inhibidores de calpaína es mucho mayor que la hallada en ausencia de los mismos ($74\% \pm 1$ frente a $42\% \pm 2$). No se observó un efecto de los inhibidores de calpaína sobre la actividad del promotor GluN1 en condiciones basales ($99\% \pm 1$ frente a 100%). El conjunto de este y anteriores experimentos permite concluir que la proteasa calpaína participa en la inhibición de la expresión del gen *glun1* en condiciones relativamente avanzadas del proceso de excitotoxicidad, mediante el procesamiento de los FTs MEF2 y CREB.

Resultados

6. Regulación del promotor del gen *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad por acción del represor transcripcional REST.

6.1. Caracterización de la inducción de la expresión de REST en cultivos primarios corticales en condiciones de excitotoxicidad.

Durante el desarrollo embrionario existe una relación inversa entre los niveles de REST y los de GluN1 (Bai et al., 2003). Quisimos comprobar, en primer lugar, si durante el proceso de diferenciación neuronal que tiene lugar en nuestros cultivos primarios se producían variaciones similares a las que tienen lugar en el desarrollo embrionario. Por tanto, analizamos por *immunoblot* los niveles de estas proteínas en cultivos primarios a 7, 14 y 21 DIVs (**Fig. 21A**). Como podemos observar, existe una disminución dramática en los niveles del represor REST a medida que avanza la diferenciación neuronal, en concordancia con un aumento en la expresión de la subunidad GluN1. Los niveles de REST son muy pequeños en neuronas maduras de 14 DIVs, que ya expresan niveles apreciables de la subunidad GluN1 del NMDAR. Los niveles de la proteína NeuN, usada como control, se mostraron constantes durante la diferenciación neuronal en los cultivos.

A continuación quisimos estudiar si en procesos de excitotoxicidad inducidos *in vitro* tenía lugar la re-expresión del represor, tal como se demostró ocurría en un modelo de isquemia cerebral donde la excitotoxicidad tenía lugar *in vivo* (Calderone et al., 2003). Para ello, cultivos primarios neuronales de 14 DIVs fueron tratados con NMDA tal como se indicó anteriormente durante tiempos variables (1, 2, 4 y 8 h) y, seguidamente, los extractos se analizaron mediante *immunoblot*. Analizamos las variaciones en los niveles de REST, comparando los resultados con los de GluN1 (**Fig. 21B**). El anticuerpo específico para REST reconoce en las neuronas sin tratar varias proteínas en el rango 120-200 kDa, que podrían corresponder a formas con diferentes modificaciones postraduccionales, posiblemente fosforilaciones, o bien a otras isoformas de esta proteína. Observamos un pequeño aumento de los niveles de represor en función de la duración del tratamiento con NMDA, en paralelo a la desaparición de GluN1. Los niveles de otras proteínas neuronales tales como la β III-tubulina, utilizada como control, no experimentaron cambios significativos.

Los resultados anteriores correlacionan con los observados en un ensayo de qRT-PCR utilizando RNA extraído de cultivos primarios neuronales (14 DIVs) tratados con NMDA durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 h) (**Fig. 21C**). Los resultados de un experimento representativo mostraron que los niveles normalizados relativos del mRNA de GluN1 disminuyeron progresivamente hasta un $32\% \pm 7$ a las 3 h de tratamiento con NMDA mientras que, en contraste, los niveles de mRNA para REST aumentaban hasta un $156\% \pm 40$ en las mismas condiciones.

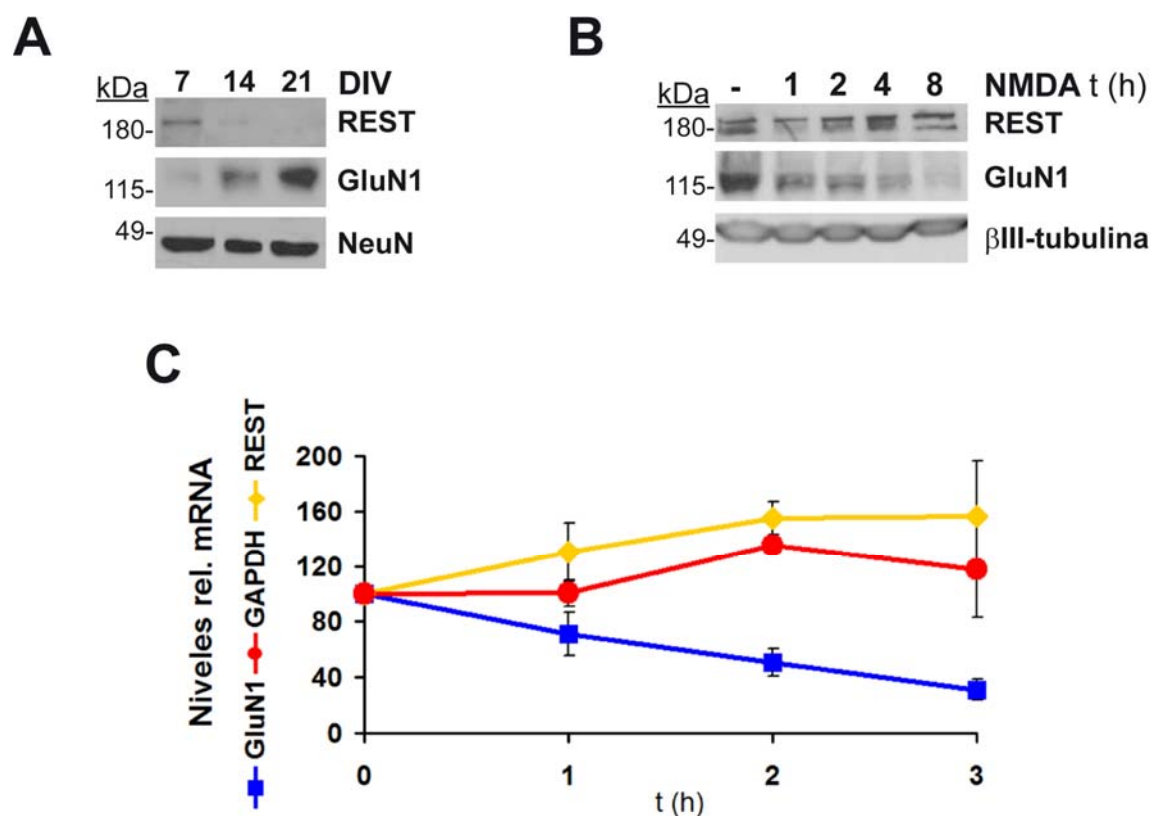


Figura 21. Caracterización de expresión de REST en cultivos primarios corticales durante su diferenciación *in vitro* y en situación de excitotoxicidad. **A)** Análisis mediante *immunoblot* de los niveles de GluN1 y REST en cultivos primarios neuronales a diferentes días de diferenciación *in vitro* (7, 14, 21 DIVs) utilizando anticuerpos específicos para estas proteínas y, como control, NeuN. **B)** Análisis por *immunoblot* de la regulación de REST en condiciones de excitotoxicidad. Los cultivos primarios (14 DIVs) fueron tratados durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8 h) con NMDA. Se utilizaron anticuerpos específicos para REST, GluN1 y βIII-tubulina. **C)** Cuantificación de los niveles de mRNA codificante para REST a distintos tiempos de tratamiento con NMDA. Los cultivos neuronales fueron tratados con NMDA durante 1, 2 y 3 h, extrayéndose a continuación el RNA de los cultivos y estableciéndose los niveles de mRNA codificantes para REST (rombos amarillos), GluN1 (cuadrados azules) o GAPDH (círculos rojos) mediante PCR cuantitativa en tiempo real con oligonucleótidos específicos. La gráfica muestra niveles normalizados de mRNA respecto a los valores obtenidos para el rRNA 18S, no modificados por el tratamiento. Los datos se representan como porcentaje del valor obtenido en las células sin tratar (100%) y se muestran valores medios ± s.d. de un experimento representativo.

Los resultados anteriores confirman la disminución progresiva de los niveles de REST durante la diferenciación neuronal en los cultivos primarios, y su re-expresión por mecanismos de tipo transcripcional en condiciones de excitotoxicidad en paralelo a la disminución de los niveles de la proteína GluN1.

Resultados

6.2. Estudio de la participación de REST en la regulación de *glun1* a través de elementos de respuesta RE1, MEF2 y CRE de su promotor.

Una vez observado que REST se re-expresaba en condiciones de excitotoxicidad, decidimos caracterizar su posible participación en el silenciamiento del gen *glun1*. En primer lugar, estudiamos el efecto de la sobre-expresión de una forma exógena de REST en los cultivos primarios neuronales sobre la actividad del promotor de *glun1*. Como se mencionó, este represor está formado por un dominio de unión al DNA que reconoce a los elementos RE1 en los promotores de los genes que regula, y los dominios N- y C-terminales, RD1 y RD2, de interacción con distintos co-represores (Andres et al., 1999; Ballas et al., 2001; Huang et al., 1999; Naruse et al., 1999; Tapia-Ramirez et al., 1997). En los experimentos mostrados a continuación utilizamos tres plásmidos cedidos por el Dr. Abderrahmani (Universidad de Lausanne, Suiza) derivados de pcDNA3, que contienen el cDNA codificante para la proteína REST humana completa (aminoácidos 1-1098, plásmido al que denominaremos cREST) y los cDNAs de dos mutantes parcialmente activos que carecen de los dominios RD1 (aminoácidos 212 a 1098, denominado cREST- Δ N) o RD2 (aminoácidos 1 a 417, denominado cREST- Δ C) (Plaisance et al., 2005). Los cultivos primarios fueron co-transfectados con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, y pcDNA3, cREST, cREST- Δ N o cREST- Δ C (0'3 μ g). A las 24 h de transfección (12 DIVs), las neuronas se trataron con NMDA durante 2 h (**Fig. 22A**). Como podemos observar en un experimento representativo, en condiciones basales la sobre-expresión de REST dio lugar a una disminución de la actividad luciferasa codificada por pGluN1 hasta un $61\% \pm 1$ respecto a los valores obtenidos con el plásmido control pcDNA3, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Como era de esperar, la expresión de los mutantes de delección de REST dio lugar a una disminución más moderada de la actividad luciferasa, alcanzándose valores del $79\% \pm 5$ y $74\% \pm 2$ respectivamente para cREST- Δ C y cREST- Δ N. En condiciones de excitotoxicidad, los niveles de actividad luciferasa fueron muy similares en las células transfectadas con pcDNA3 o con cualquiera de los cDNAs de REST. Por tanto, estos experimentos muestran que REST es un represor del promotor de *glun1* que precisa de los elementos RD1 y RD2 para llevar a cabo eficientemente dicha regulación y que, en condiciones de excitotoxicidad, la re-expresión del represor endógeno es probablemente suficiente para bloquear al máximo la función del promotor proximal de *glun1*, que no es afectada ulteriormente por un aumento en los niveles de REST.

Uno de los mecanismos utilizados por REST para la regulación de la expresión génica está mediado por su unión a elementos de respuesta RE1 en los promotores de los genes que regula. Por tanto, es muy probable que REST regule la expresión de *glun1* mediante su unión al elemento RE1

presente en posición -150/-131 de su promotor, implicado en la regulación de este gen durante la diferenciación neuronal (Bai et al., 2003) (ver Fig. 12).

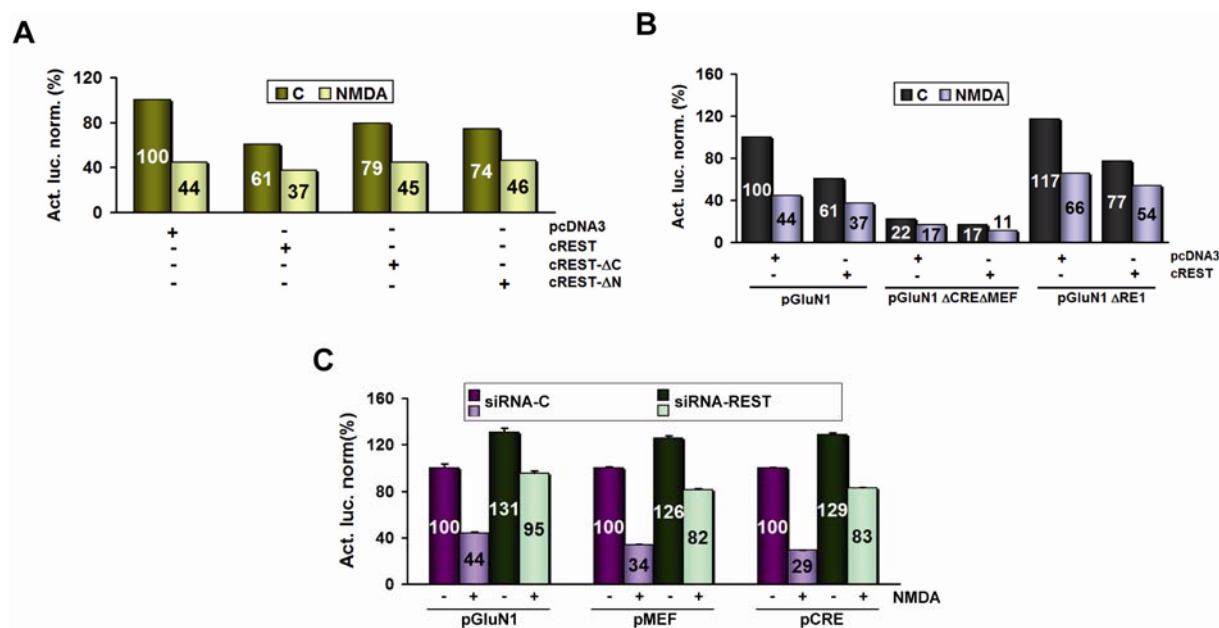


Figura 22. Estudio de la participación de REST en la regulación del promotor de GluN1 e identificación de las secuencias responsables. **A)** Efecto de la sobre-expresión de REST sobre la regulación del promotor *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados durante 24 h como anteriormente con pGluN1 y pRL-null, y 0'3 μg de cREST, plásmido que contiene la secuencia de cDNA completa para el gen humano, cREST-ΔC o cREST-ΔN, que codifican formas mutantes de REST carentes de las regiones C- y N-terminales respectivamente, o pcDNA3. Seguidamente se trataron los cultivos con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido en las células transfectadas con pcDNA3, a las que se dio un valor arbitrario de 100%, mostrándose valores medios ± s.d. de un experimento representativo. **B)** Identificación de las secuencias necesarias para la regulación del promotor *glun1* por REST. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados durante 24 h como anteriormente con pRL-null y pGluN1, pGluN1 ΔCREΔMEF o pGluN1ΔRE1, además de 0'3 μg de cREST o pcDNA3, según se indica. Seguidamente, los cultivos se trataron con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido en las células transfectadas con pGluN1 y pcDNA3 y sin tratar, a las que arbitrariamente se dio un valor de 100%, mostrándose valores medios ± s.d. de un experimento representativo. **C)** Efecto del silenciamiento de la expresión de REST sobre la actividad del promotor de *glun1* y la de promotores CRE y MEF2 canónicos. Se co-transfectaron cultivos primarios neuronales igual que anteriormente con pRL-null y pGluN1, pMEF o pCRE, junto con una mezcla de tres siRNAs específicos para REST (siRNA-REST, 5 pmoles) o un siRNA control (siRNA-C, 5 pmoles). Tras 24 h de transfección, los cultivos se trataron con NMDA durante 2 h según se indica. La actividad luciferasa normalizada se presenta, para cada plásmido reportero, como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar y transfectadas con siRNA-C, al que se asigna un valor arbitrario de 100%, mostrándose valores medios ± s.d. de un experimento representativo.

Nos planteamos estudiar, en primer lugar, como afectaría la delección de este elemento a la regulación del promotor *glun1* mediada por la proteína REST endógena utilizando un plásmido reportero análogo a pGluN1 pero en cual el elemento RE1 en posición -150/-131 había sido delecionado (pGluN1ΔRE1; cedido por el Dr. Guang Bai, Universidad de Maryland, USA) (Bai et al., 2003). Para ello, co-transfectamos los cultivos primarios con pGluN1 o pGluN1ΔRE1, junto con pRL-null y pcDNA3 (0'3 μg) y, a las 24 h de trasfección, las células fueron tratadas o no con NMDA durante 2 h (Fig. 22B). Como podemos observar, el elemento RE1 analizado está implicado en la

Resultados

regulación negativa de GluN1 ya que su delección aumentaba los niveles de actividad luciferasa tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad con respecto a los cultivos transfectados con la forma salvaje del promotor. Con objeto de estudiar el efecto de la sobre-expresión de REST sobre el promotor delecionado, transfectamos los cultivos de igual manera pero sustituyendo el plásmido pcDNA3 por cREST (**Fig. 22B**). El efecto represor de REST sobre el promotor salvaje de pGluN1 descrito anteriormente fue menor para pGluN1 Δ RE1, tanto en condiciones basales ($77\% \pm 3$ para pGluN1 Δ RE1 versus $61\% \pm 1$ para pGluN1), como excitotóxicas ($54\% \pm 1$ para pGluN1 Δ RE1 versus $37\% \pm 1$ para pGluN1), indicando que REST necesitaba este sitio RE1 para silenciar la actividad del promotor de *glun1* tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. Sin embargo, el hecho de que la actividad luciferasa de pGluN1 Δ RE1 se redujese notablemente por la sobre-expresión de REST, tanto en condiciones basales ($77\% \pm 3$ versus $117\% \pm 7$) como de excitotoxicidad ($54\% \pm 1$ versus $66\% \pm 2$), sugiere la existencia de otros elementos de respuesta para este represor transcripcional en el promotor proximal de *glun1* todavía por identificar. Experimentos similares a los anteriores realizados con el vector pGluN1 Δ CRE Δ MEF (**Fig. 22B**), que conserva intacto el elemento RE1 en posición -150/-131, mostraron un efecto menos acusado de la sobre-expresión de REST ($17\% \pm 1$ versus $22\% \pm 2$ respectivamente para cultivos co-transfectados con cREST o pcDNA3). En conjunto, estos resultados muestran que REST regula negativamente al promotor de *glun1*, tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad, a través del sitio RE1 en posición -150/-131, si bien también es probable la participación de otros elementos de respuesta de este promotor como las secuencias MEF2 en posiciones -812/-789 y -2363/-2341 y las CRE en los nucleótidos -343/-296.

Los resultados anteriores parecían también sugerir que REST participa en el establecimiento de los niveles basales de actividad del promotor de *glun1* en neuronas diferenciadas en cultivo. Decidimos abordar esta posibilidad mediante experimentos de interferencia génica en los que co-transfectamos los plásmidos pGluN1 y pRL-null con una mezcla de tres siRNAs específicos para el represor REST (siRNA-REST, 5pmoles) o un siRNA control carente de secuencias conocidas de reconocimiento (siRNA-C, 5pmoles) (**Fig. 22C**). Observamos que los niveles de actividad luciferasa en los cultivos transfectados con siRNA-REST eran superiores a los obtenidos experimentos en paralelo con siRNA-C, resultado que demuestra la importancia de la función de este silenciador génico en el establecimiento de los niveles basales de esta subunidad del NMDAR en las neuronas diferenciadas. Además, la inducción del proceso de excitotoxicidad en estas mismas condiciones confirmó la importante participación de REST en la inhibición de la expresión de *glun1* debida a la sobreactivación del NMDAR. Experimentos similares a los anteriores fueron realizados co-transfectando de nuevo siRNA-REST o siRNA-C con los plásmidos pMEF o pCRE canónicos (**Fig. 12C**). El objetivo era analizar si, tal como parecían sugerir los experimentos de la **figura 22B**, REST era

capaz de regular de alguna manera la expresión de genes a través de elementos de respuesta CRE o MEF2. Como podemos observar, ambos promotores se comportaron de manera similar a pGluN1 ya que la interferencia de REST con sus siRNA específicos dio lugar a un aumento de la actividad luciferasa en condiciones basales y, además, el porcentaje de inhibición inducido por el NMDA fue mucho menor al obtenido en las células transfectadas con el siRNA-C. Estos datos demuestran que REST puede regular la expresión génica a través de elementos CRE o MEF2, lo que sugiere que este represor podría participar en la regulación de genes que como *glun1* contienen secuencias MEF2 y CREs en su promotor.

En conjunto, este bloque de resultados permite concluir que existe un mecanismo de regulación negativa mediada por el represor REST que actúa sobre promotores que contienen elementos CRE y MEF2 y que, en el caso del promotor de *glun1*, dicha regulación se produciría principalmente a través de sus elementos CRE (-343/-296) y MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) que actuarían junto con las secuencias RE1 (-150/-131).

7. Regulación de la expresión de GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad a través de mecanismos epigenéticos mediados por HDACs.

7.1. Efecto del tratamiento con nicotinamida sobre la regulación de *glun1* inducida en condiciones de excitotoxicidad: posible participación de HDACs de clase III.

La nicotinamida es un precursor del NAD^+ además de un inhibidor de las HDACs NAD^+ -dependientes o sirtuinas, enzimas que integran el control metabólico y la regulación de la transcripción. El tratamiento con este compuesto previene la depleción de NAD^+ que tiene lugar en procesos caracterizados por un profundo estrés bioenergético, como son la excitotoxicidad y la isquemia, protegiendo a las neuronas de la muerte (Liu et al., 2009). Por otra parte, se ha demostrado un efecto neuroprotector de Sirt1 en la enfermedad de Huntington (Jeong et al., 2012; Jiang et al., 2012) y de Sirt3 en cultivos neuronales sometidos a excitotoxicidad (Kim et al., 2011). En una primera aproximación estudiamos el efecto de la nicotinamida sobre la actividad del promotor de *glun1* (**Fig. 23A**), para lo cual transfectamos como anteriormente cultivos primarios neuronales con pGluN1 y pRL-null, que a continuación tratamos con dos concentraciones de nicotinamida (10 y 25 mM) durante 24 h. Posteriormente, tratamos estos cultivos con NMDA durante 2 h. Pudimos observar que en presencia de la concentración menor de nicotinamida (10 mM) existía una recuperación significativa de la actividad luciferasa obtenida en condiciones de excitotoxicidad respecto a los cultivos sin tratar con nicotinamida ($79\% \pm 2$ versus $52\% \pm 2$; $^{###}p < 0.001$). Por el contrario, el tratamiento con nicotinamida 25 mM no tuvo efecto sobre la actividad del promotor de

Resultados

glun1 en presencia de NMDA (**Fig. 23A**). En condiciones basales, tampoco se observaron cambios significativos de la actividad luciferasa a ninguna de las dos concentraciones de nicotinamida utilizadas ($104\% \pm 4$ y $101\% \pm 4$, respectivamente para 10 y 25 mM).

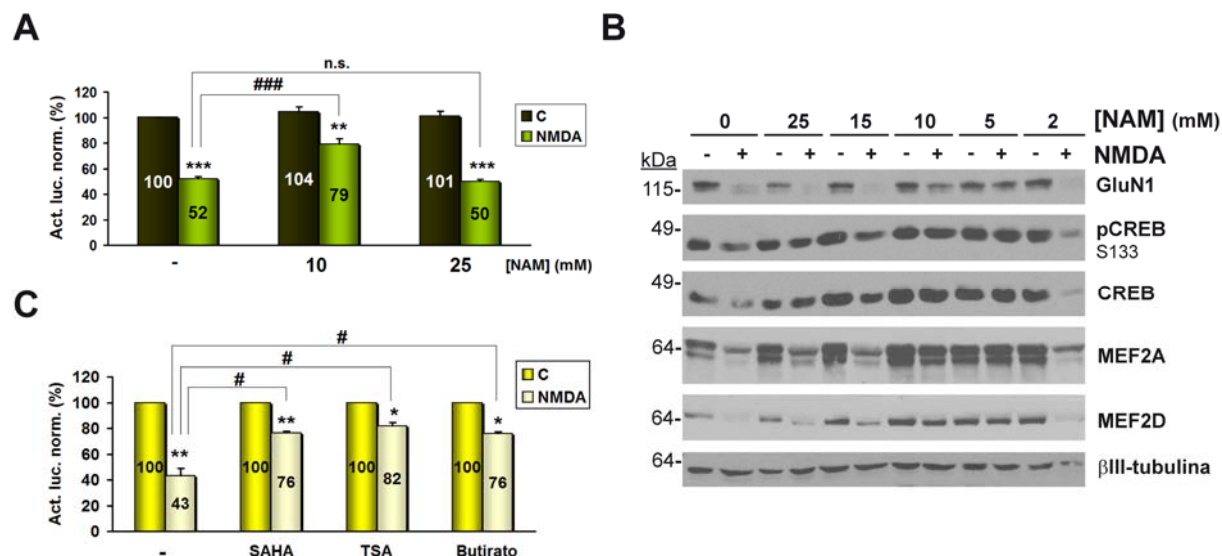


Figura 23. Efecto del tratamiento con nicotinamida sobre la regulación de *glun1* inducida en condiciones de excitotoxicidad. **A)** Efecto de la concentración de nicotinamida sobre la actividad del promotor de *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales co-transfectados con pGluN1 junto con pRL-null como anteriormente fueron tratados durante las 24 h de transfección con nicotinamida (NAM, 10 y 25 mM) y, seguidamente, incubados con NMDA durante 2 h. La nicotinamida es un precursor del NAD^+ además de un inhibidor de las HDACs NAD^+ -dependientes o sirtuinas. La actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar, a las que asignamos un valor arbitrario de 100%, mostrándose valores medios \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada comparando los datos de la actividad luciferasa de cultivos sin estimular versus los estimulados con NMDA para cada una de las condiciones de NAM ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$). También se comparan los datos obtenidos en presencia de NMDA para los cultivos tratados con NAM respecto a los sin tratar ($^{###}p < 0.001$; n.s., estadísticamente no significativo). **B)** Efecto de la concentración de nicotinamida sobre la regulación de GluN1 en excitotoxicidad. Análisis por *immunoblot* de proteínas extraídas de cultivos primarios neuronales (14 DIVs) tratados durante 24 h con NAM a diferentes concentraciones (2, 5, 10, 15, 25 mM) y, posteriormente, con NMDA durante 4 h según se indica. Se utilizaron anticuerpos específicos para GluN1, CREB, pCREB S133, MEF2D, MEF2A y como control βIII-tubulina. **C)** Efecto de diferentes inhibidores de HDACs de clases I y II sobre la actividad del promotor de *glun1* en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales co-transfectados con pGluN1 junto con pRL-null como anteriormente fueron tratados durante las 24 h de transfección con los inhibidores de HDACs SAHA (2 μM), TSA (1 μM) y butirato (0.5 mM) y, seguidamente, incubados con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa se presenta doblemente normalizada y como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar con NMDA, al que se asignó en cada caso un valor arbitrario de 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. y los cálculos estadísticos se realizaron igual que anteriormente ($n=3$; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$). También se comparan los datos obtenidos en presencia de NMDA y cada uno de los inhibidores respecto a los cultivos tratados sólo con NMDA ($^{\#}p < 0.05$).

Seguidamente, decidimos estudiar en mayor profundidad el efecto de la dosis de nicotinamida sobre la inhibición de la expresión de la subunidad GluN1 en condiciones de excitotoxicidad. Para ello, pre-tratamos cultivos primarios neuronales durante 24 h con distintas concentraciones de nicotinamida (2, 5, 10, 15 y 25 mM) y posteriormente incubamos con NMDA durante 4 h (**Fig. 23B**). El análisis por *immunoblot* mostró una recuperación parcial de los niveles de proteína GluN1 en los

cultivos tratados con concentraciones de 5 y 10 mM de nicotinamida previamente a la inducción del proceso de excitotoxicidad, pero no con el resto de concentraciones ensayadas. Los resultados publicados en la literatura muestran que el efecto neuroprotector de Sirt1 esta mediado por su deacetilación de ciertos residuos en determinados FTs como Foxo3a (*forkhead box O3A*) (Jiang et al., 2012) o el co-activador de CREB, TORC1 (Jeong et al., 2012), lo que conduce a su activación y la inducción de la expresión de BDNF y otros genes diana neuroprotectores. Por tanto, en condiciones de excitotoxicidad, el efecto del tratamiento con las concentraciones intermedias de nicotinamida sobre la expresión de GluN1 podría ser debido a la preservación de la actividad de FTs claves en la regulación de *glun1*. Decidimos investigar esta hipótesis caracterizando los FTs CREB y MEF2 en estas mismas muestras (**Fig. 23B**). Los resultados para pCREB y CREB total fueron muy similares entre sí y mostraron una recuperación muy elevada de su actividad en cultivos tratados con NMDA en presencia de nicotinamida a concentraciones 5 y 10 mM, y algo más moderada para 15 y 25 mM. En el caso de MEF2A y MEF2D, la respuesta a la dosis de nicotinamida fue mucho más similar a la de GluN1, siendo los efectos más notables los obtenidos para concentraciones de nicotinamida de 5 y 10 mM. Como control de estos experimentos analizamos la proteína neuronal β III-tubulina que no sufre cambios en presencia de nicotinamida.

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con nicotinamida en un estrecho margen de concentraciones (5-10 mM) reduce el nivel de inhibición de la expresión de GluN1 inducido por la excitotoxicidad por un mecanismo que afecta a la actividad de su promotor. Adicionalmente, estos datos sugieren que la pérdida de la actividad de esta familia de HDACs en condiciones de excitotoxicidad, probablemente a consecuencia de la importante disminución de los niveles de NAD^+ asociada con este proceso, podría tener una contribución importante en la inactivación de los FTs CREB y MEF2 y, a través de ellos, en la inhibición de la expresión de la subunidad GluN1. El tratamiento con nicotinamida por encima de una dosis crítica (>2 mM) podría ser suficiente para prevenir la depleción de NAD^+ y permitir la función de las sirtuinas, incluso en presencia de NMDA. Sin embargo, dado que la nicotinamida es también un inhibidor de la actividad deacetilasa de las sirtuinas, concentraciones muy elevadas de este compuesto (>15 mM) podrían cooperar con la pérdida de NAD^+ para la inhibición de estas enzimas. En el futuro trataremos de mostrar si esta hipótesis es correcta y establecer de que manera las sirtuinas regulan la actividad de los FTs CREB y MEF2.

7.2. Participación de las HDACs de clase I y II en la regulación de GluN1.

Hemos abordado también la posible participación de las HDACs de clase I y II en la regulación de GluN1 mediante la utilización de inhibidores específicos bien caracterizados de estas enzimas que se

Resultados

ha demostrado tienen un papel neuroprotector frente al daño isquémico (Endres et al., 2000; Faraco et al., 2006; Kim et al., 2007; Ren et al., 2004; Yildirim et al., 2008). Algunos datos publicados han sugerido una posible participación de estas HDACs en la regulación de FTs importantes en la regulación de *glun1*, ya que la expresión ectópica de una forma de HDAC4 resistente al transporte nuclear en neuronas ganglionares de cerebelo promueve la apoptosis neuronal y la represión de genes reporteros con elementos MEF2 y CRE (Bolger and Yao, 2005). Como primera aproximación, co-transfectamos los cultivos primarios con pGluN1 y pRL-null, como se describió previamente, añadiendo a continuación los inhibidores de las HDACs de clase I y II SAHA (2 μ M), TSA (1 μ M) y butirato (0.5 mM) que permanecieron en el medio durante las 24 h de transfección. Pasado ese tiempo, los cultivos fueron incubados con NMDA durante 2 h. Como podemos observar en el histograma (**Fig. 23C**), la disminución de la actividad luciferasa inducida en condiciones de excitotoxicidad fue mucho más moderada en presencia de los tres inhibidores utilizados en comparación con la obtenida en cultivos tratados sólo con NMDA. En estos últimos, la actividad luciferasa alcanzó valores del $43\% \pm 6$, significativamente inferiores a los obtenidos en presencia de NMDA y SAHA ($76\% \pm 2$; $^{\#}p<0.05$; $n=3$), TSA ($82\% \pm 3$; $^{\#}p<0.05$; $n=3$) o butirato ($76\% \pm 3$; $^{\#}p<0.05$; $n=3$). Estos resultados demuestran que las HDACs de clase I y II participan en la represión del promotor GluN1 en excitotoxicidad.

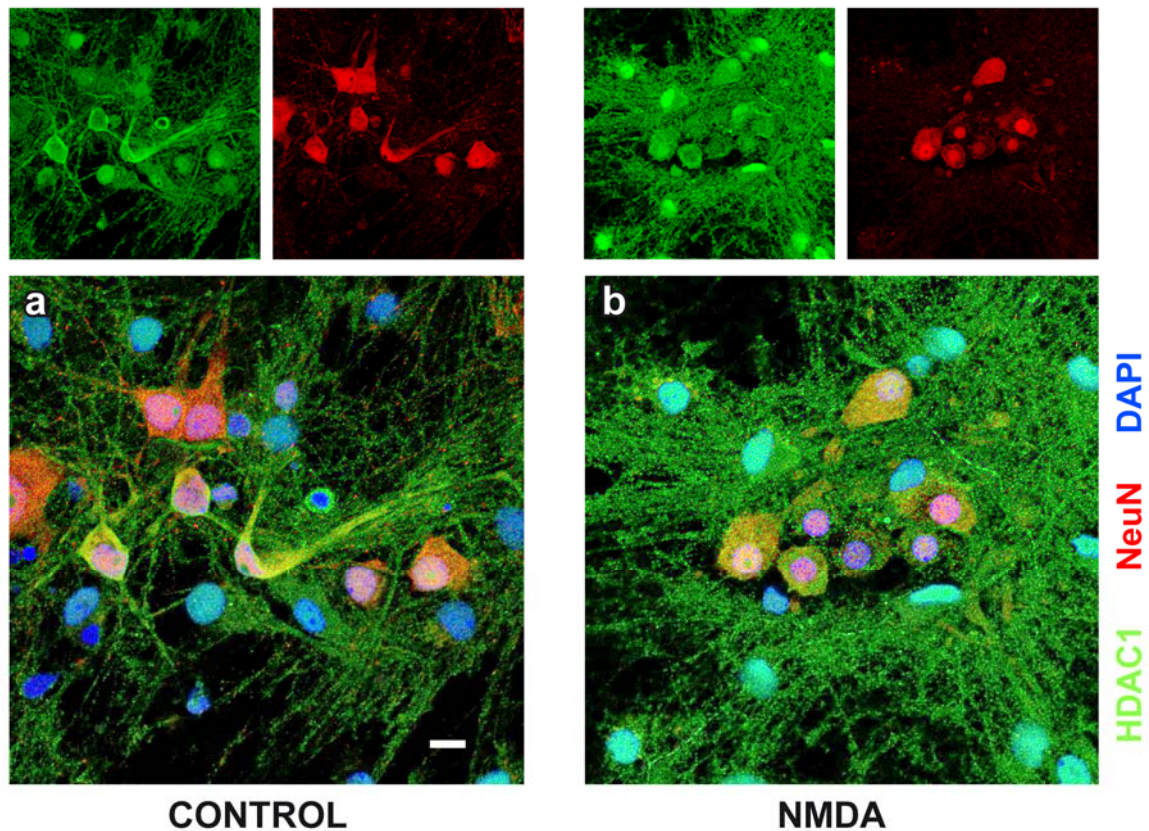
7.3. Caracterización de la expresión de HDAC1 y de su participación en la regulación del promotor GluN1 en condiciones basales y de excitotoxicidad.

En los experimentos anteriores habíamos demostrado que tanto REST como las HDACs de clase I y II tienen un papel importante en el silenciamiento de la expresión de *glun1* durante el proceso de excitotoxicidad. La proteína REST establece múltiples interacciones proteicas para formar complejos represores en los que participan diversas HDACs, a través de mSin3A (Grimes et al., 2000; Huang et al., 1999; Naruse et al., 1999) o CoREST, incluyendo complejos con HDAC1/2 (Ballas et al., 2001; Humphrey et al., 2001; You et al., 2001). Como primera aproximación, decidimos abordar la posible participación de HDAC1 en la represión de *glun1*. Se ha descrito en la literatura que HDAC1 se expresa en la corteza cerebral, preferentemente en el núcleo (Broide et al., 2007) y, por ello, quisimos estudiar la localización exacta de esta deacetilasa en los cultivos primarios, tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. Realizamos doble inmunofluorescencia y microscopía confocal de cultivos primarios neuronales de 14 DIVs utilizando anticuerpos específicos para HDAC1 y la proteína neuronal NeuN (**Fig. 24A**). Observamos que, en las neuronas, HDAC1 se distribuía en el cuerpo celular y las dendritas y, en menor proporción, en el núcleo (**Fig. 24A, panel a**). La estimulación de estos cultivos con NMDA durante 30 min indujo un aumento global en la intensidad

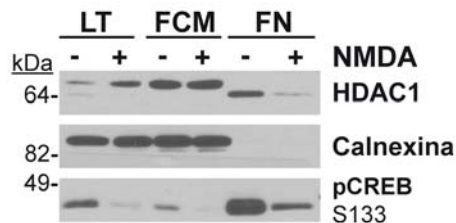
de la tinción neuronal, si bien la distribución de HDAC1 era similar (**Fig. 24A, panel b**). Tanto en los cultivos tratados como sin tratar también se observó la presencia de HDAC1 en las células gliales presentes en los cultivos mixtos, y una mayor tinción nuclear en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 24C, panel b**). Para completar estas observaciones, realizamos a continuación un fraccionamiento subcelular de los cultivos primarios, tanto en condiciones basales como tras la inducción de excitotoxicidad mediante el tratamiento con NMDA durante 2 h (**Fig. 24B**). Este fraccionamiento permitió separar las fracciones nuclear (FN) y posnuclear o citoplásmica (FCM) tras la lisis controlada de las membranas celulares y su comparación con un lisado total (LT) de las mismas células sin fraccionar. Las diferentes fracciones fueron analizadas mediante *immunoblot* con anticuerpos específicos para HDAC1, calnexina y pCREB, estos últimos usados como controles del fraccionamiento. Como podemos observar, en el extracto total se detectaron dos proteínas de alrededor de 64 kDa, siendo la de mayor movilidad electroforética regulada negativamente en excitotoxicidad, mientras que la de menor movilidad se regulaba positivamente en presencia de NMDA. Curiosamente estas dos proteínas segregaron en diferentes fracciones celulares, pudiendo observar que la primera era nuclear mientras que la segunda permanecía en la fracción posnuclear o citoplásmica. Comprobamos que el fraccionamiento celular se había realizado correctamente mediante el análisis de calnexina (proteína del retículo endoplásmico) y pCREB (FT nuclear). En estos experimentos, y tal como se observó para pCREB, las proteínas nucleares estaban concentradas 5 veces respecto al resto como consecuencia de haberse igualado la cantidad de proteína de cada fracción subcelular sometida a electroforesis. Este resultado permite concluir que existen dos formas de HDAC1 reconocidas por el anticuerpo utilizado, quizá originadas por algún tipo de modificación postraducciona, y que mientras la forma nuclear se regula negativamente, la citosólica lo hace positivamente en excitotoxicidad.

Seguidamente analizamos en mayor detalle la cinética de regulación de HDAC1 a distintos tiempos de tratamiento con NMDA (0, 2, 5, 15, 30, 60, 120 y 240 min) (**Fig. 24C**). El análisis por *immunoblot* mostró que la banda de menor movilidad aumenta muy rápidamente sus niveles desde los 2 min de tratamiento, alcanzando un máximo a los 5 min, y posteriormente se mantiene constante hasta prácticamente las 2 h de tratamiento con NMDA. Por el contrario, los niveles de la forma nuclear permanecieron prácticamente constantes a lo largo del tratamiento. Tampoco observamos cambios para la β III-tubulina, usada como control. Por tanto, desde tiempos muy tempranos de tratamiento con NMDA se produce la inducción, y posiblemente modificación, de HDAC1 por mecanismos que será necesario analizar. Al igual que HDAC2, esta proteína modificadora sufre a su vez diferentes modificaciones postraduccionales incluyendo fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, nitrosilación y carbonización (Segre and Chiocca, 2010).

A



B



C

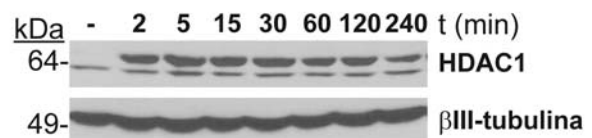


Figura 24. Caracterización de la regulación de HDAC1 en excitotoxicidad. **A)** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión y localización de HDAC1 en cultivos de neuronas corticales de 14 DIVs sin tratar (panel a) o tratados durante 30 min con NMDA (panel b). Se realizaron inmunotinciones dobles en células fijadas y permeabilizadas con los anticuerpo para HDAC1 (verde) y NeuN (rojo). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes muestran resultados representativos y corresponden a secciones individuales de microscopía confocal. Se presentan los tres canales fusionados, o los canales verde o rojo por separado. Barra de escala: 10 μm. **B)** Análisis de la localización subcelular de la proteína HDAC1. Cultivos primarios de 14 DIVs fueron tratados con NMDA durante 2 h y, a continuación, sometidos a un fraccionamiento subcelular que permitió separar las fracciones nuclear (FN) y posnuclear o citoplásmica (FCM) tras la lisis controlada de la membrana plasmática. También se muestra un lisado total (LT) de las mismas células sin fraccionar. Cantidades iguales de proteína (50 μg) fueron sometidas a *immunoblot* con el anticuerpo de HDAC1. Como controles del fraccionamiento, se analizaron una proteína nuclear (pCREB S133) y otra posnuclear (calnexina, proteína del retículo endoplásmico). **C)** Análisis por *immunoblot* de la regulación de HDAC1 en excitotoxicidad. Cultivos primarios de 14 DIVs fueron tratados o no con NMDA durante los tiempos indicados (0, 2, 15, 30, 60, 120 y 240 min). Se muestra la expresión de HDAC1 y βIII-tubulina.

Con objeto de empezar a analizar la posible participación de HDAC1 en la regulación de la expresión de GluN1 utilizamos como primera aproximación el inhibidor MS-275, que inhibe preferentemente a la HDAC1 ($IC_{50} = 0.3 \mu M$), aunque también puede inhibir a HDAC3 ($IC_{50} = 8 \mu M$) y HDAC8 ($IC_{50} > 100 \mu M$). Estudiamos la actividad del promotor de *glun1* en respuesta a distintas concentraciones de MS-275 (0, 1, 3, 5, 10, 40 y 80 μM), tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad (**Fig. 25A**). Para ello, los cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, y pre-tratados durante 1 h con las concentraciones indicadas de MS-275. Posteriormente, las neuronas se trataron o no con NMDA durante 2 h. Como podemos observar, en condiciones basales la actividad del promotor aumentó ligeramente a las concentraciones menores de MS-275 respecto a los cultivos sin tratar ($105\% \pm 2$ y $115\% \pm 2$, respectivamente, para 1 y 3 μM). La actividad luciferasa no aumentó mucho más al aumentar la concentración de MS-275 hasta 80 μM . En presencia de NMDA, observamos una recuperación muy importante de la actividad luciferasa para concentraciones de MS-275 de 1 y 3 μM ($68\% \pm 2$ y $78\% \pm 3$, respectivamente) en comparación con la obtenida sólo en presencia de NMDA ($44\% \pm 4$). De nuevo, no se observaron grandes cambios en la actividad luciferasa de pGluN1 en presencia de dosis más altas de MS-275. Por tanto, estos resultados sugerían fuertemente la participación de HDAC1 en la inhibición de la actividad del promotor *glun1* tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad, siendo poco probable la participación de HDAC3 o HDAC8 en dicha regulación.

Anteriormente habíamos demostrado que REST era capaz de reprimir promotores que contenían secuencias CRE y MEF2 canónicas y que éste podría ser uno de los mecanismos de regulación del promotor de *glun1*, además del reconocimiento de las secuencias RE1 (-150/-131). Con objeto de investigar si HDAC1 está implicado en este mecanismo de represión transcripcional, co-transfectamos los cultivos primarios con pCRE, pMEF y la forma mutada de MEF utilizada anteriormente, pmMEF, junto con pRL-null. Tras la transfección, las células fueron pre-tratadas durante 1 h con MS-275 (10 μM) y posteriormente tratadas o no con NMDA durante 2 h (**Fig. 25B**). Podemos observar que tanto pCRE como pMEF2 se comportaron de manera similar, ya que la actividad luciferasa aumentó ligeramente en condiciones basales como consecuencia de la inhibición de HDAC1 ($117\% \pm 2$ para pMEF y $121\% \pm 1$ para pCRE versus 100% para los cultivos sin tratar). Además, en condiciones excitotóxicas la disminución de la actividad promotora fue mucho más moderada tras la inhibición de HDAC1 ($83\% \pm 2$ versus $37\% \pm 2$ para pMEF; $71\% \pm 0.3$ versus $28 \pm 0.3\%$ para pCRE). Estas variaciones no se observaron con pmMEF. Podemos concluir por tanto que HDAC1 está implicado en la represión de genes con elementos de unión para los FTs CREB y MEF2 y, por tanto, muy probablemente regula la expresión del gen *glun1*.

Resultados

Para demostrar de forma directa la participación de HDAC1 en la regulación de *glun1*, realizamos seguidamente experimentos de interferencia génica en los que co-transfectamos los plásmidos pGluN1 y pRL-null con una mezcla de dos siRNAs específicos para HDAC1 (siRNA-HDAC1, 5pmoles) o un siRNA control carente de secuencias conocidas de reconocimiento (siRNA-C, 5pmoles). Tras 24 de transfección, se trataron los cultivos con NMDA durante 2 h.

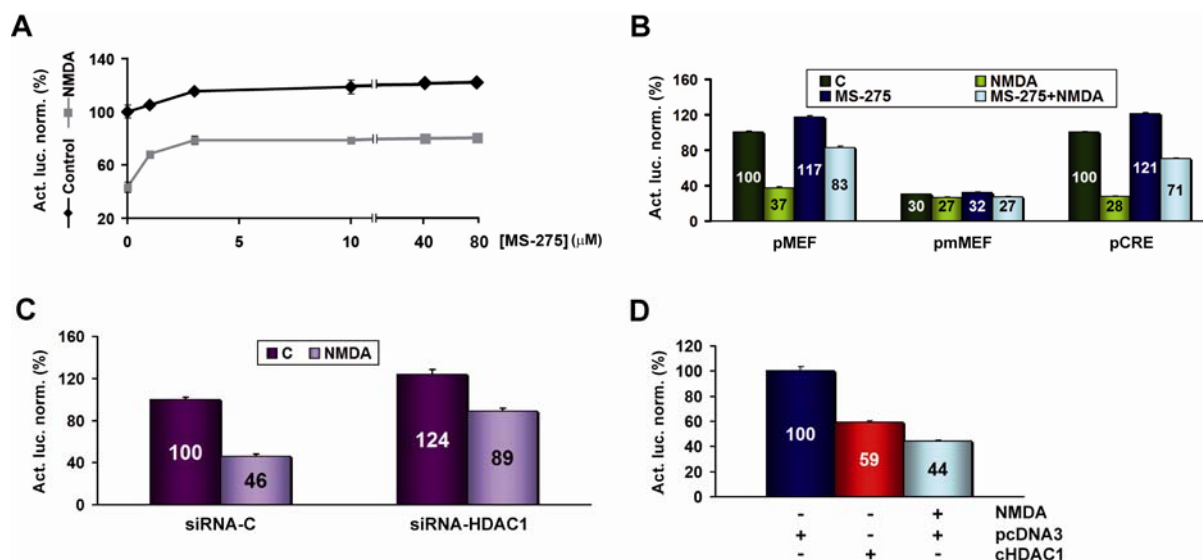


Figura 25. Análisis de la participación de HDAC1 en la regulación del promotor de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad. **A)** Efecto de la concentración de MS-275 sobre la actividad del promotor de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados como anteriormente con pGluN1 y pRL-null durante 24 h. A continuación, los cultivos fueron pre-tratados durante 1 h con MS-275 a distintas concentraciones (1, 3, 5, 10, 40 y 80 μ M) y posteriormente incubados durante 2 h en presencia de NMDA (línea gris) o sin tratar con el agonista (línea negra). Se presentan resultados de actividad luciferasa normalizada como valores relativos a los obtenidos en las células no tratadas con NMDA ni MS-275, a las que se le asignó un valor arbitrario de 100%, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo. **B)** Efecto de la inhibición de HDAC1 sobre la actividad de promotores CRE y MEF2 canónicos. Se co-transfectaron cultivos primarios de 11 DIVs con pMEF, pmMEF o pCRE, junto con pRL-null. A las 24 h de transfección, se pre-trataron los cultivos correspondientes con MS-275 (10 μ M) durante 1 h y, posteriormente, se incubaron con NMDA durante 2 h según se indica. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido para las células no tratadas con NMDA ni MS-275 y transfectadas con pMEF (en caso de pMEF y pmMEF) o pCRE, a los que arbitrariamente asignamos un 100%. Se muestran valores medios \pm s.d. de un experimento representativo. **C)** Efecto del silenciamiento de la expresión de HDAC1 sobre la actividad del promotor *glun1*. Se co-transfectaron cultivos primarios neuronales igual que anteriormente con pGluN1 y pRL-null, junto con una mezcla de dos siRNAs específicos para HDAC1 (siRNA-HDAC1, 5 pmoles) o un siRNA control (siRNA-C, 5pmoles). Tras 24 h de transfección, se trataron los cultivos con NMDA durante 2 h según se indica. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido en las células sin tratar con agonista y transfectadas con siRNA-C, al que se dio un valor arbitrario de 100%, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo. **D)** Efecto de la sobre-expresión de HDAC1 sobre la actividad del promotor *glun1*. Cultivos primarios neuronales se co-transfectaron durante 24 h como anteriormente con pGluN1 y pRL-null, además de 0.3 μ g de cHDAC1, plásmido que contiene el cDNA de HDAC1, o pcDNA3, según se indica. Seguidamente, los cultivos se trataron con NMDA durante 2 h. La actividad luciferasa se presenta y como porcentaje del valor obtenido en las células transfectadas con pcDNA3 y sin tratar, a las que arbitrariamente se dio un valor de 100%, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo.

Como podemos observar en un experimento representativo (**Fig. 25C**), la interferencia de HDAC1 produjo un aumento de la actividad luciferasa basal de pGluN1 respecto a los cultivos sin interferir

(124% \pm 5 versus 100%) y una recuperación de la actividad en condiciones de excitotoxicidad (89% \pm 3 versus 46% \pm 3). Es decir, que frente al 46% de actividad remanente en los cultivos transfectados con el siRNA control, la interferencia con siRNA-HDAC1 permite mantener un 71% de la actividad luciferasa tras el tratamiento con NMDA. Este resultado confirma que HDAC1 tiene un papel muy importante en la regulación del promotor de *glun1* tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. Finalmente, decidimos estudiar el efecto de la sobre-expresión de la HDAC1 sobre la actividad del promotor *glun1* utilizando un plásmido que contiene el cDNA de HDAC1 insertado en pcDNA3, al que denominaremos cHDAC1 (cedido por el Dr. Kouzarides, Universidad de Cambridge, Cambridge, UK). Los cultivos primarios fueron co-transfectados con pGluN1 y pRL-null, como se explicó anteriormente, y pcDNA3 o cHDAC1 (0'3 μ g). A las 24 h de transfección (12 DIVs), algunos cultivos se trataron con NMDA durante 2 h según se indica (**Fig. 25D**). Pudimos observar que, cuando sobre-expresábamos HDAC1, la actividad luciferasa de pGluN1 disminuía hasta el 59% \pm 1, en comparación con la actividad luciferasa del promotor cotransfectado con pcDNA3 y sin tratar (100%). La actividad promotora de *glun1* tras el tratamiento con NMDA en los cultivos control transfectados con pcDNA3 fue del 44% \pm 1.

A la vista de todos estos resultados, podemos concluir que HDAC1 participa en la inhibición de *glun1* tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad, y muy probablemente lo hace a través de secuencias de reconocimiento para los FTs MEF2 y CREB presentes en el promotor de GluN1.

8. Análisis de la participación conjunta de REST y HDAC1 en la regulación del promotor GluN1 en condiciones basales.

En esta tesis hemos demostrado de manera independiente la participación de REST y HDAC1 en la represión del promotor *glun1* (**Figs. 22 y 25**). El silenciamiento génico mediado por REST requiere el reclutamiento de HDACs a sus extremos RD1 y RD2, particularmente HDAC1 y HDAC2. Sin embargo, las actividades de las HDACs van más allá de la modificación de la cromatina y, además de histonas, estas proteínas deacetilan otros sustratos entre los que destacan varios FTs (Bolger and Yao, 2005) (Bouwman and Philipsen, 2002; Gu and Roeder, 1997; Marzio et al., 2000). Por tanto, y con objeto de profundizar en el mecanismo de regulación de *glun1*, nos propusimos estudiar en detalle si REST y HDAC1 estaban actuando de una manera dependiente, o de forma independiente. En primer lugar, caracterizamos si los efectos derivados de la sobre-expresión de REST sobre la actividad luciferasa del promotor *glun1* requerían de la función de HDAC1. Para ello, co-transfectamos cultivos primarios neuronales con pGluN1 y pRL-null, como anteriormente, en presencia de los siRNAs control o siRNA-HDAC1 (5pmoles) y los plásmidos pcDNA3 o cREST (0'3 μ g), según se indica (**Fig. 26A**). Como podemos observar, la presencia de HDAC1 era absolutamente

Resultados

requerida para el efecto represor de REST sobre el promotor *glun1*, ya que, tras la interferencia de HDAC1, la actividad luciferasa no sufrió cambios significativos al sobre-expresar REST ($120\% \pm 2$) en comparación con los cultivos transfectados con pcDNA3, que expresaban niveles basales de este represor ($122\% \pm 4$). Seguidamente, realizamos un experimento complementario al anterior, en el que sobre-expresamos HDAC1 e interferimos la expresión de REST (**Fig. 26B**). En estas condiciones, la sobre-expresión de HDAC1 no tenía prácticamente efecto sobre la actividad luciferasa de pGluN1 que fue muy similar a la obtenida en los cultivos transfectados con pcDNA3 y, por tanto, expresando niveles basales de esta HDAC ($121\% \pm 4$ versus $131\% \pm 4$). Estos resultados muestran que el represor REST es necesario para la regulación por HDAC1 de la transcripción de *glun1* y sugieren que, caso de existir mecanismos propios de HDAC1 independientes de la función de REST, su contribución sería muy pequeña.

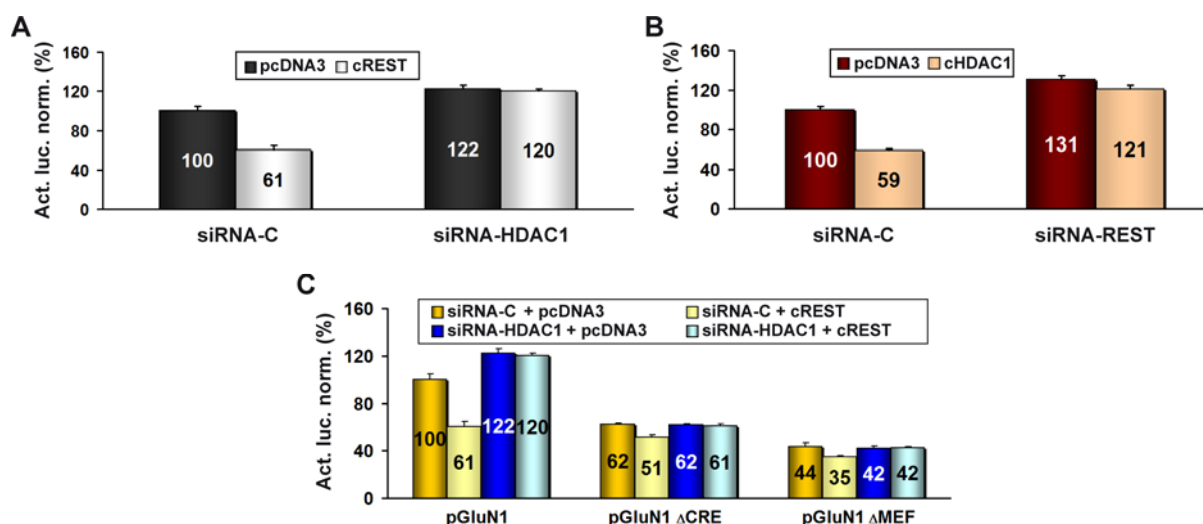


Figura 26. Estudio de la participación conjunta de REST y HDAC1 en la regulación del promotor de *glun1*. Efecto del silenciamiento de la expresión de HDAC1 (**A**) o REST (**B**) sobre la actividad del promotor *glun1* en células que sobre-expresan respectivamente REST o HDAC1. Los cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados como anteriormente durante 24 h con pGluN1 y pRL-null, además de 0'3 μg de cHDAC1, cREST o pcDNA3 y 5 pmoles de siRNA-C, siRNA-HDAC1 o siRNA-REST según se indica en cada caso. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del valor obtenido en las células transfectadas con siRNA-C y pcDNA3 (100%, para cada experimento), mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo. **C**) Efecto del silenciamiento de la expresión de HDAC1 sobre la actividad de formas mutantes del promotor *glun1* en células que sobre-expresan REST. Los cultivos primarios neuronales fueron co-transfectados como anteriormente durante 24 h con pRL-null y pGluN1, pGluN1ΔCRE o pGluN1ΔMEF, además de 0'3 μg de cREST o pcDNA3 y 5 pmoles de siRNA-C o siRNA-HDAC1 según se indica. La actividad luciferasa normalizada se presenta como porcentaje del resultado obtenido en las células transfectadas con siRNA-C y pcDNA3, mostrándose valores medios \pm s.d. de un experimento representativo.

Resultados anteriores obtenidos en esta tesis sugerían la posible participación de los elementos MEF2 (-812/-789, -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor de *glun1* en la regulación de su transcripción a través del represor REST, además de la secuencia RE1 en posición -150/-131 (**Fig. 22B**). Teniendo en cuenta estos datos y los resultados anteriores, nos propusimos confirmar si el

complejo REST/HDAC1 reprimía la transcripción basal de *glun1* en los cultivos primarios a través de los sitios MEF2 o CRE anteriores. Para ello, co-transfectamos cada uno de los promotores *glun1* doblemente mutados (pGluN1 Δ CRE o pGluN1 Δ MEF) junto con pRL-null, como anteriormente, en presencia de los siRNAs control o siRNA-HDAC1 (5 pmoles) y los plásmidos pcDNA3 o cREST (0'3 μ g) según se indica (**Fig. 26C**). Como podemos observar, los efectos sobre la actividad luciferasa de la sobre-expresión de REST o la interferencia de HDAC1 se vieron muy reducidos para los plásmidos pGluN1 Δ CRE y pGluN1 Δ MEF en comparación con pGluN1. De nuevo, la sobre-expresión de REST cuando estaba interferida la expresión de HDAC1 no tenía ningún efecto adicional. En conjunto, todos estos resultados muestran que REST, con la participación obligada de HDAC1, reprime de forma basal la expresión de *glun1* fundamentalmente a través de su reconocimiento de los elementos MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) de su promotor.

9. Caracterización de la asociación de CREB, MEF2 y HDAC1 en condiciones basales y de excitotoxicidad.

Los resultados anteriores demostraban la interacción de forma basal de pCREB con las secuencias MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor de *glun1*, y su inducción en condiciones de excitotoxicidad (**Figs. 15B y C**), observación que estaba de acuerdo con la cooperación demostrada entre los motivos MEF2 y CRE en la regulación del promotor de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 14D**). Por otra parte, los experimentos de la sección anterior (**Fig. 26C**) mostraban que estas mismas secuencias, junto con el elemento RE1 (-150/-131) (**Fig. 22B**), eran necesarias para la represión del promotor *glun1* mediada por REST y HDAC1 en condiciones basales y de excitotoxicidad. Con estos datos, decidimos investigar la posibilidad de que existiera una asociación y formación de algún tipo de complejo entre los FTs CREB y MEF2 entre si, y de estos con los represores. Existen datos en la literatura que demuestran la existencia de algunas interacciones establecidas entre los FTs CREB y MEF2 y ciertas HDACs que producen la inhibición de la transcripción y que apoyarían nuestra hipótesis. Por un lado, en células HEK293 tratadas con cAMP, HDAC1 bloquea la fosforilación de CREB a través de una interacción estable con PP1, y este complejo HDAC1/PP1 sería necesario para la atenuación de la respuesta de CREB tras el tratamiento (Canettieri et al., 2003). Por otro lado, en el caso de MEF2 se ha descrito la formación de un complejo con PP1 α y HDAC4 que reprime de manera muy potente la transcripción dependiente de MEF2 e interfiere con sus efectos pro-supervivencia en neuronas de hipocampo (Perry et al., 2009).

Hemos analizado en primer lugar las posibles asociaciones de MEF2 y CREB con HDAC1, para lo cual realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para pCREB

Resultados

utilizando fracciones nucleares obtenidas mediante fraccionamiento sub-celular de cultivos primarios (14 DIVs) tratados o no con NMDA durante 2 h (**Fig. 27**).

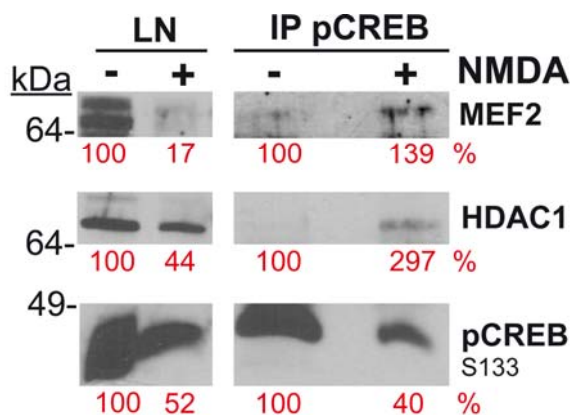


Figura 27. Estudio de la posible asociación de CREB, MEF2 y HDAC1. Cultivos primarios neuronales de 14 DIVs se trataron con NMDA durante 2 h para purificar a continuación su fracción nuclear. El extracto nuclear preparado en tampón RIPA fue inmunoprecipitado con anticuerpos específicos para pCREB S133. Las proteínas inmunoprecipitadas y los lisados nucleares (LN) de partida fueron analizados mediante *immunoblot* con anticuerpos específicos para HDAC1 y pCREB S133, y un anticuerpo total de MEF2 que sin embargo reconoce con mayor eficiencia la proteína MEF2A. Debajo de cada panel se muestran los porcentajes obtenidos mediante densitometría de las bandas inmunoprecipitadas en dos experimentos independientes, tomando arbitrariamente como 100% los valores de los cultivos sin tratar.

Como podemos observar en el análisis por *immunoblot* de las proteínas inmunoprecipitadas, el FT CREB activado se asociaba claramente con una isoforma de MEF2 que muy probablemente corresponde a MEF2A, la isoforma reconocida más eficientemente por el anticuerpo total utilizado en este experimento. Esta asociación se observó a muy bajos niveles ya de forma basal, aunque se indujo notablemente en condiciones de excitotoxicidad. Así, los niveles de la proteína MEF2 presentes en los inmunoprecipitados de pCREB eran del 139% en presencia de NMDA respecto a la situación basal, a pesar de que los niveles de las proteínas pCREB y MEF2 en el lisado nuclear de partida eran notoriamente inferiores en condiciones de excitotoxicidad (respectivamente 48% y 83% menores). Una situación muy similar se observó al analizar la asociación de CREB total con MEF2 (datos no mostrados). En el caso de HDAC1, es muy notable la asociación de esta proteína con pCREB en las condiciones de excitotoxicidad. Los niveles de HDAC1 presentes en los inmunoprecipitados de pCREB eran del 297% en presencia de NMDA respecto a la situación basal, a pesar de que los niveles de las proteínas pCREB y HDAC1 en el lisado nuclear de partida eran respectivamente un 48% y un 56% menores. En el futuro será interesante confirmar estos resultados y analizar la posible presencia de PP1 y/o REST en estos complejos proteicos.

Estos resultados sugieren que los FTs CREB y MEF2 se asocian por mecanismos desconocidos en complejos que reconocen de manera coordinada las secuencias MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor de *glun1*. Estos complejos DNA/proteína son favorecidos en

condiciones de excitotoxicidad, situación en la que incorporan la proteína HDAC1 mediante una fuerte asociación con la forma activa de CREB.

10. Estudio de la regulación de GluN1 y de las proteínas implicadas en su control transcripcional en un modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando un modelo experimental de isquemia cerebral focal transitoria por oclusión de la arteria media cerebral (ACM) mostraron la desaparición de la subunidad obligatoria GluN1 del NMDAR a las 24 y 48 h tras el daño isquémico debido al proceso de excitotoxicidad inducido *in vivo* (Gascon et al., 2005). La desaparición de la proteína GluN1 se correlacionaba con la disminución de los niveles de su mRNA codificante desde tiempos tempranos del proceso de isquemia lo que sugería que la regulación de la expresión de esta subunidad del NMDAR era muy probablemente debida a mecanismos de tipo transcripcional, tal como se había demostrado en el modelo de excitotoxicidad *in vitro* (Gascon et al., 2005). Para profundizar en la caracterización de la regulación de las subunidades GluN1 y estudiar otras proteínas que hemos demostrado en esta tesis que participan en su regulación transcripcional en un modelo celular de excitotoxicidad, hemos utilizado un modelo alternativo de isquemia focal permanente inducida por fototrombosis (Schroeter et al., 2002). Este modelo tiene la ventaja de ser poco invasivo y produce infartos pequeños y reproducibles en la corteza cerebral en el territorio de la ACM derecha, que pueden visualizarse mediante la tinción con colorantes vitales tales como el TTC (**Fig. 28A**). Una ventaja adicional de este modelo es su relativa simplicidad, muy importante cara a un futuro análisis de la eficacia de las herramientas de neuroprotección que se podrían generar a partir de los datos de esta tesis.

Con objeto de comparar diferentes niveles de daño neuronal, los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos tras la irradiación (2'5, 24 y 72 h) y comparados con animales "*sham-operated*" (Sham), es decir, sometidos a todo el proceso excepto la irradiación con la luz fría. En los experimentos de *immunoblot* presentados en la **figura 28B** se compararon el tejido isquémico aislado del hemisferio ipsilateral (I) y la región cortical equivalente en el hemisferio contralateral (C), usada como control interno. Como podemos observar, los niveles de GluN1 en el hemisferio ipsilateral no sufrieron grandes cambios respecto a los obtenidos en el correspondiente tejido contralateral hasta las 24 h, aunque posteriormente disminuyeron drásticamente hasta ser casi indetectables a las 72 h. Esta cinética de regulación parece ser algo más lenta que la observada anteriormente en el modelo de MCAO (Gascon et al., 2005), si bien será necesario analizar un número mayor de animales para saberlo con seguridad. Los niveles de CREB y pCREB sufrieron cambios similares entre si, mostrando una disminución progresiva en el hemisferio ipsilateral

Resultados

respecto al contralateral a partir de las 24 h. Esta disminución muy probablemente era debida a la activación de la calpaína propia del proceso de isquemia (Hong et al., 1994a), aspecto que fue confirmado en este experimento mediante el análisis del procesamiento de su sustrato espectrina. En la región isquémica era posible observar la formación de los fragmentos característicos de 145 y 150 kDa a partir de las 2'5 h de daño, si bien estos se incrementaban a las 24 h. El estudio con los anticuerpos MEF2A y MEF2D mostró un patrón muy similar para ambas proteínas, y análogo a su vez al obtenido para CREB y pCREB, que disminuyeron de forma progresiva en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral a partir de las 24 h y fueron indetectables a las 72 h. Este resultado era esperable, dada la participación de la calpaína en la regulación de los niveles de los FTs MEF2A y MEF2D en fases avanzadas del proceso de excitotoxicidad observada en los experimentos *in vitro* presentados anteriormente (Fig. 20A).

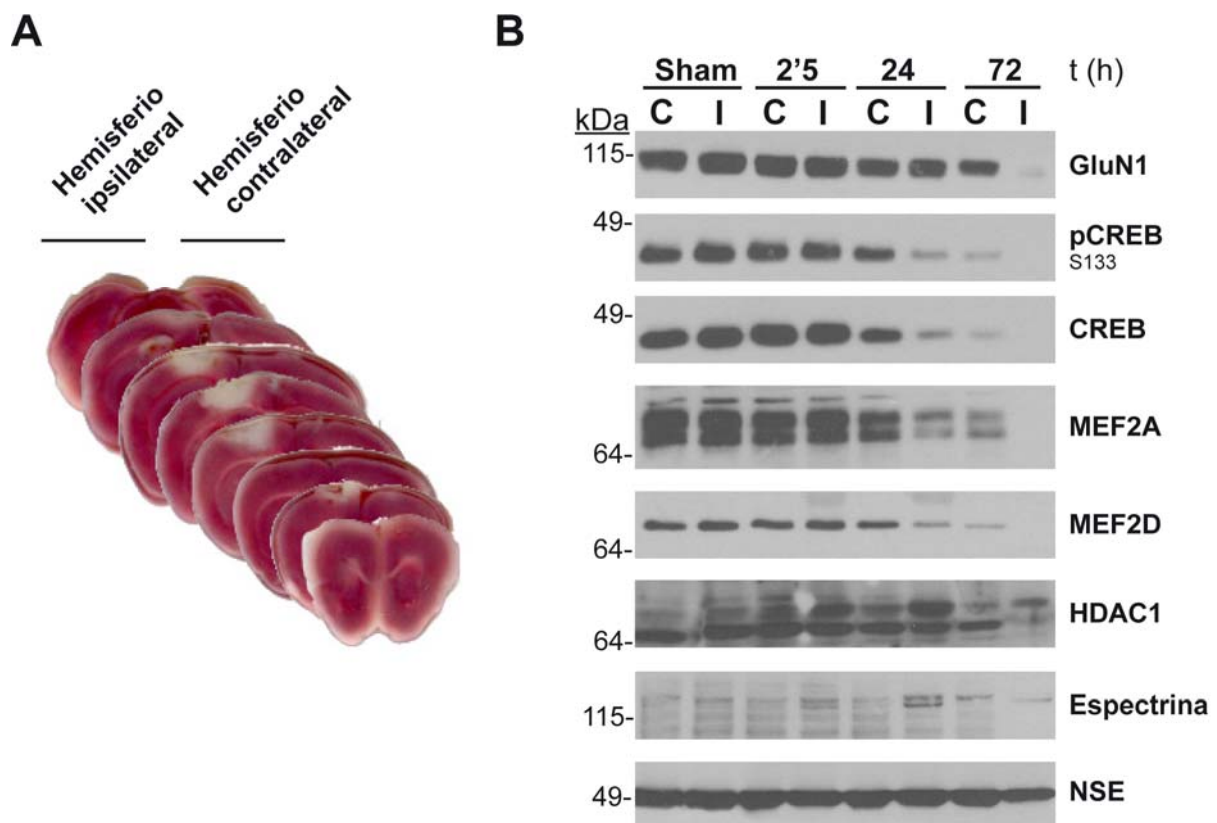


Figura 28. Estudio de la regulación de GluN1 y de diversas proteínas implicadas en su regulación en un modelo animal de isquemia cerebral por fototrombosis. **A)** Secciones coronales de cerebro de ratones Swiss adultos (25-30 g) en los que se indujo daño endotelial mediante la administración i.p. del compuesto Rosa de Bengala (10 mg/kg) e iluminación con luz fría de la corteza del hemisferio ipsilateral (I) sobre la bifurcación de la arteria medial cerebral (ACM). Los animales fueron sacrificados 72 h tras la inducción del daño isquémico y se muestra la tinción con el colorante vital (TTC) de 8 secciones coronales consecutivas de 1 mm de grosor. Se observa el infarto producido en la región ipsilateral (I) como una zona hipocromática que contrasta con la región equivalente del hemisferio contralateral (C). **B)** Análisis por *immunoblot* de tejido cerebral de ratones control (*sham-operated*) o sacrificados a distintos tiempos después de inducir el daño isquémico (0, 2'5, 24 y 72 h). Los niveles de expresión de la subunidad GluN1 fueron analizados en extractos proteicos (50 µg) preparados a partir del tejido infartado (I) o la región equivalente en el hemisferio contralateral (C). Además de GluN1 se analizó la regulación de otras proteínas mediante el uso de los anticuerpos indicados. Como controles usamos la espectrina y la proteína NSE.

Un resultado muy interesante fue el obtenido para HDAC1. Observamos dos proteínas de tamaños similares a los descritos anteriormente en los cultivos primarios (aproximadamente 65-70 kDa), siendo los niveles de la de mayor movilidad electroforética muy estables, salvo a las 72 h en que resultaba casi indetectable en la región isquémica. Sin embargo, los niveles de la proteína de menor movilidad electroforética sufrieron un aumento considerable en las regiones isquémicas para todos los tiempos de irradiación, incluso a las 72 h. Esta proteína correspondería con la que se inducía durante el proceso de excitotoxicidad *in vitro* (**Fig. 24C**) y cuya localización subcelular era citoplásmica (**Fig. 24B**). Los niveles de otras proteínas neuronales, tales como NSE, no se modificaron sustancialmente con la isquemia, demostrando que la disminución de los niveles de las subunidades GluN1 y los cambios producidos en el resto de proteínas analizadas es resultado de mecanismos específicos y no una consecuencia general del proceso de muerte neuronal inducido por la excitotoxicidad *in vivo*. Podemos concluir que, en el modelo de isquemia cerebral inducida por fototrombosis, la disminución de los niveles de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D, y la inducción de la proteína HDAC1 en el tejido isquémico preceden a la desaparición de la subunidad GluN1 del NMDAR, siendo probable que exista una relación causa-efecto entre estos procesos.

DISCUSIÓN

El trabajo presentado en esta tesis ha permitido caracterizar en profundidad algunos de los mecanismos de regulación de la expresión de la subunidad GluN1 del NMDAR tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad. Adicionalmente, a través de la caracterización de la regulación del gen *glun1*, hemos mostrado cómo afecta la excitotoxicidad a la función de factores y cofactores clave para la transcripción de genes implicados en la supervivencia neuronal que podrán ser investigados como posibles dianas de neuroprotección frente al daño isquémico y/o enfermedades neurodegenerativas. Hemos continuado los trabajos previos del laboratorio donde se había demostrado que la sobre-estimulación de los NMDARs en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral afectaba a la expresión del propio receptor mediante, entre otros mecanismos, la inhibición de la transcripción del gen codificante para la subunidad GluN1 (Gascon, Deogracias et al. 2005). En primer lugar, hemos caracterizado en mayor detalle la cinética de regulación de GluN1 en los cultivos primarios neuronales desde tiempos tempranos de tratamiento con NMDA, demostrando que ésta se induce de manera muy temprana en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* y es debida a un mecanismo de tipo transcripcional mediado por elementos de regulación comprendidos en la región promotora proximal del gen *glun1* (Fig 11 A-D). Seguidamente, hemos examinado la actividad del promotor de *glun1* en distintas condiciones experimentales y caracterizado el requerimiento de diversos elementos de respuesta en *cis* y proteínas en *trans* para su función. Finalmente, también hemos analizado cómo afecta la sobreactivación del NMDAR a los niveles y actividad de algunos de los factores y cofactores que participan en la regulación de GluN1 utilizando modelos de excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.

1. Identificación de los elementos CRE y MEF2 necesarios para la regulación de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad.

Los FTs CREB (Lau, Saha et al. 2004) y MEF2C (Krainc, Bai et al. 1998) son importantes en la activación de la transcripción del gen *glun1* durante el desarrollo embrionario. Estas proteínas y el resto de isoformas de MEF2, con papeles centrales en el control transcripcional de genes importantes para la función y supervivencia neuronales, sufren procesos de inactivación en condiciones de excitotoxicidad (Hardingham, Fukunaga et al. 2002; Gong, Tang et al. 2003). Por tanto, consideramos razonable analizar en primer lugar la posible participación de estos FTs en la activación/represión de *glun1* en cultivos tratados con diferentes concentraciones de NMDA. En una primera parte del estudio nos apoyamos en el uso de promotores MEF2 y CRE canónicos y en mutantes de delección generados en el promotor de *glun1*, cuya actividad fue ensayada en neuronas mediante su fusión con genes reporteros. El análisis *in silico* del promotor de *glun1* permitió la predicción de un motivo MEF2 en posición -2363/-2341, no caracterizado con anterioridad, además

del existente en los nucleótidos -811/-788, identificado anteriormente como un sitio de reconocimiento para MEF2C durante el desarrollo embrionario (Kravinc, Bai et al. 1998). Ambas secuencias MEF2 fueron deletadas independientemente [pGluN1 Δ MEF (-812/-789) y pGluN1 Δ MEF (-2363/-2341)] o de forma conjunta (pGluN1 Δ MEF) del promotor de *glun1*, tal como se indicó en la **figura 12**. Respecto a los motivos CRE, es de destacar la predicción *in silico* de al menos 5 de estas secuencias en el promotor proximal de *glun1* (**Fig. 12**), de las cuales los elementos en posiciones -315/-293, -343/-324 y -502/-482 habían sido identificados previamente como críticos para la expresión de GluN1 durante el desarrollo neuronal (Lau, Saha et al. 2004). En este caso, como primera aproximación, decidimos eliminar de forma conjunta los dos elementos CRE más proximales (-343/-296; pGluN1 Δ CRE; **Fig. 12**) ya que algunos resultados previos mostraban que la secuencia -356/-1 del promotor de *glun1* contenía una parte importante de los elementos de respuesta necesarios para su represión en excitotoxicidad. Con objeto de caracterizar posibles sinergias entre los FTs CREB y MEF2, generamos también un mutante cuádruple en el que se deletaron los dos sitios MEF2 y los dos CRE del promotor de *glun1* (pGluN1 Δ CRE Δ MEF). El análisis de estos mutantes muestra que los elementos de respuesta MEF2 y CRE anteriores contribuyen a la actividad basal del promotor proximal del gen *glun1* en los cultivos primarios sin tratar con NMDA (**Fig. 14A y C**), lo que sugiere la participación de los FTs MEF2 y CREB en la regulación de GluN1 también en neuronas diferenciadas en cultivo. Sin embargo, el papel de los FTs de la familia MEF2 parece ser más importante que el de CREB ya que la eliminación de los motivos MEF2 tiene un efecto mucho más acusado sobre la regulación basal del promotor *glun1* que la de los CREs (**Fig. 14C**). Estos mismos elementos de respuesta eran necesarios para la activación del promotor *glun1* por concentraciones sub-tóxicas de agonista (**Fig. 14E**) y su represión en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 14B y D**). Es interesante la gran similitud existente en los patrones de respuesta a la concentración de NMDA entre el promotor *glun1* y los promotores CRE y MEF2 canónicos (**Fig. 13**), lo que sugiere un papel preponderante de los FTs CREB y MEF2 en la regulación de la expresión de este gen tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad.

Aunque los elementos MEF2 y CRE parecen actuar de manera independiente en la activación del promotor *glun1*, su represión en condiciones de excitotoxicidad ocurre por un mecanismo que requiere ambos tipos de elementos (**Fig. 14D**). A pesar de que, como dijimos, los elementos CRE tienen menor importancia en la regulación basal de *glun1*, la deletación de las secuencias CRE y MEF2, bien cada una por separado o ambas juntas, tiene efectos muy similares sobre la actividad del promotor *glun1* en condiciones de excitotoxicidad. Este resultado permite hipotetizar la existencia de algún tipo de complejo, formado en condiciones de excitotoxicidad, que incluiría los cuatro elementos reguladores en el DNA anteriormente mencionados, que cooperarían en la regulación del

promotor de *glun1*. Para analizar esta hipótesis hemos realizado experimentos de ChIP en cultivos primarios tratados con NMDA durante 30 min (**Fig. 15**), condiciones suficientes para la activación de los mecanismos represores sobre el promotor *glun1* (**Fig. 11D**), si bien la actividad de CREB esta todavía por encima de los niveles basales (**Fig. 15A**). El análisis de las secuencias promotoras inmunoprecipitadas con los anticuerpos para CREB y pCREB muestra que este FT aparece asociado no sólo con los sitios CREs (-343/-324) y (-315/-293) del promotor de *glun1* sino también con los motivos MEF2 (-812/-789) y (-2363/-2341), estando favorecidas estas interacciones en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 15B y C**). Este resultado sugiere la posibilidad de que, a través de una asociación con MEF2 probablemente mediada por una proteína/s todavía por determinar, CREB sea capaz de asociarse con las secuencias MEF2 del promotor de *glun1*, formándose un complejo DNA/proteína que involucraría los dos motivos CRE y los dos MEF2 del promotor de *glun1* y, al menos, las proteínas CREB y MEF2. El complejo DNA/proteína anterior sería necesario para la represión del promotor del gen *glun1* en condiciones de excitotoxicidad y requeriría de forma absoluta la presencia de las secuencias -343/-296, -812/-789 y -2363/-2341 del promotor de *glun1* que cooperarían en su formación. En la célula eucariota son relativamente frecuentes este tipo de sinergias, mediadas en parte por la interacción de FTs unidos a sus secuencias específicas en el DNA, y tienen mucha importancia por las múltiples posibilidades de regulación transcripcional que se generan por combinatoria y la formación de redes de regulación génica. Concretamente, se ha descrito que la interacción de MEF2C con el FT ubicuo Sp1 tiene un papel determinante en la regulación del gen *glun1* durante el desarrollo embrionario aunque, en este caso, el efecto de la mutación de los motivos MEF2 (-812/-789) y Sp1 (-292/-269) es diferente (Krainc, Bai et al. 1998).

2. Regulación de la expresión de GluN1 por modulación de la vía BDNF/TrkB/ERK5/MEF2.

La participación de los FTs MEF2 y CREB en la regulación basal de la expresión de GluN1 en los cultivos primarios de neuronas corticales diferenciadas *in vitro* (**Fig. 14A y C**) nos llevó a interesarnos por los mecanismos que mantienen la actividad de estos FTs en las neuronas de forma basal. En primer lugar decidimos explorar la activación de rutas de señalización específicas mediadas por el factor neurotrófico BDNF, que sabemos induce la expresión de las subunidades del NMDAR, GluN1, GluN2A y GluN2B por un mecanismo transcripcional (Caldeira, Melo et al. 2007), probablemente dependientes de la activación de CREB (Lund, Hu et al. 2008). En primer lugar analizamos la actividad de diversos promotores que contienen motivos CRE, tanto de forma basal como en presencia de BDNF añadido al medio de cultivo (**Fig. 16A**). Al igual que ocurre para *glun1*, los promotores del receptor de neurotrofinas TrkB (Kingsbury, Murray et al. 2003; Deogracias, Espliguero et al. 2004), el promotor III de BDNF (Shieh, Hu et al. 1998; Tao, Finkbeiner et al. 1998) o un CRE canónico se

expresan de forma basal en los cultivos primarios, y esta expresión es favorecida por la adición de BDNF. La activación del promotor de TrkB por BDNF es mucho menor cuando sus dos elementos CRE son delecionados lo que sugiere que la regulación por BDNF está mediada por la activación de CREB. De hecho, hemos podido comprobar bajos niveles de actividad TrkB y CREB de forma basal y su activación por el tratamiento con BDNF, que también provocaba un aumento notorio en los niveles de subunidad GluN1 (**Fig. 16B**). Adicionalmente, el bloqueo de la vía BDNF/TrkB endógena en los cultivos sin estimular mediante un anticuerpo neutralizante de BDNF permite confirmar la presencia de neurotrofina en los mismos y su participación en la activación de forma basal del promotor de *glun1*. Por tanto, estos resultados demuestran la regulación de la expresión del gen *glun1* en condiciones basales por una vía BDNF/TrkB probablemente mediada por la activación de CREB.

Muy recientemente, se ha publicado la demostración de que, en efecto, las secuencias CRE del promotor *glun1* participan en la síntesis *de novo* de subunidad inducida por BDNF que, mediante la activación y fosforilación de TrkB, da lugar a la activación de la vía de las MAPKs Ras/ERK y la unión de CREB y Egr3 a sus elementos de respuesta en el promotor proximal de *glun1* (Kim, Roberts et al. 2012). A diferencia de estos autores, nosotros hemos investigado la activación de la vía de las MAPKs Rap 1/MEKK2/MEK5/ERK5 ya que la quinasa ERK5 tiene un papel esencial en la supervivencia neuronal mediado por la fosforilación, entre otros, de miembros de la familia MEF2 (Watson, Heerssen et al. 2001; Liu, Cavanaugh et al. 2003) y CREB (Watson, Heerssen et al. 2001). Los resultados obtenidos nos han permitido concluir que GluN1 se regula en los cultivos primarios en condiciones basales por un mecanismo que implica la vía BDNF/TrkB/ERK5, estando esta quinasa presente de forma endógena en los cultivos y siendo fuertemente activada por la adición de BDNF exógeno (**Fig. 17C y 17D**). Es muy interesante la observación de que la sobre-expresión de ERK5 tiene un efecto activador mucho más acusado sobre promotores MEF2 canónicos que sobre los CRE y que, de acuerdo con ello, la regulación del promotor *glun1* está mediada principalmente por elementos de respuesta en *cis* de la familia MEF2 y, en menor medida, CRE (**Fig. 17B**). Por tanto, en respuesta al tratamiento con BDNF, ERK5 participa en la regulación de la expresión génica mayoritariamente a través de la activación de FTs de la familia MEF2.

Por otra parte, hemos demostrado una participación de esta quinasa en condiciones de excitotoxicidad en la regulación de GluN1. Por los resultados obtenidos en la **figura 18A**, vemos que la recuperación de la actividad promotora en presencia del cDNA de ERK5 y NMDA es evidente frente al control sin tratar, y precisamente también, en la regulación en excitotoxicidad de *glun1*, participan los elementos de respuesta MEF2 anteriormente mencionados (**Fig. 18B**). No son muchos los datos que relacionan ERK5 con MEF2 en excitotoxicidad o isquemia pero sí existe una publicación en la que MEF2C se activa mediante la interacción con ERK5 en el tiempo de reperusión posisquemia en la zona CA1 del hipocampo y este complejo es inhibido por un oligonucleótido antisentido de ERK5

observándose un aumento de la muerte celular por apoptosis (Wang, Zhang et al. 2009). Por tanto, la interacción ERK5-MEF2C y consecuente activación de este FT juega un papel fundamental en la supervivencia neuronal mediante la regulación de genes entre los cuales, y según nuestros resultados, se encontraría *glun1*. Ya habíamos demostrado previamente que este gen se regulaba por MEF2 y CREB, aunque podemos sugerir por nuestros resultados, y a falta de hacer más experimentos, que el FT CREB no regula nuestro promotor *glun1* a través de la cascada de señalización de ERK5. A este respecto, podemos pensar que existirán otras vías de activación dependientes de BDNF que podrían activar CREB, como CaMKs, GSK3 β /Akt, vías que nosotros hemos comenzado a investigar en el laboratorio pero en las que no hemos profundizado todavía (resultados no mostrados en esta tesis) y que serán objeto de un estudio más detallado en el futuro.

3. Regulación negativa de GluN1 mediada por REST y distintas clases de HDACs, principalmente HDAC1.

El promotor de *glun1* posee secuencias de unión a FTs represores REST/NRSF denominadas RE1 (**Fig.12**). Además, ya estaba descrito que el elemento RE1 en posición (-150/-131) participaba en la regulación de GluN1 durante el desarrollo (Bai et al., 2003). Nosotros hemos podido comprobar como esta secuencia es fundamental para la regulación de esta subunidad en excitotoxicidad (**Fig. 22B**) ya que en ausencia de este sitio la actividad promotora de GluN1 se recupera parcialmente. Además, hemos comprobado que la delección de esta secuencia es importante para la regulación del promotor de *glun1* en condiciones basales, ya que en su ausencia la actividad luciferasa del promotor aumenta. Los niveles de REST/NRSF, que son muy bajos en las neuronas maduras (14 DIVs, **Fig. 21A**) utilizadas como modelo de excitotoxicidad, aumentan moderadamente al tratar con NMDA en paralelo a una disminución de GluN1 (**Fig. 21B**). Esta observación es interesante porque en un modelo de daño isquémico, las neuronas destinadas a morir re-expresan REST/NRSF (Calderone et al., 2003). Aunque se ha descrito que la función silenciadora de este represor necesita de la inhibición del FT Sp1 (Plaisance et al., 2005), no hemos considerado importante la disminución de Sp1 en nuestros cultivos ya que es prácticamente idéntica a la de GluN1, por tanto no creemos que pueda estar implicado en su regulación (resultados no mostrados). Además, este resultado se correlaciona con los datos recientes de la literatura donde se describe y demuestra que algunos genes neuronales están regulados negativamente por REST, y los co-represores que este recluta, en condiciones de isquemia cerebral en neuronas hipocámpales, incluyendo principalmente el gen *glua2*, y también los genes *glun1* o *nf κ B* (Noh et al., 2012), estos genes tienen la particularidad de que poseen en sus promotores diversos sitios RE1 donde se uniría REST y ejercería la función negativa de la que hemos hablado. Durante las fases finales de la escritura de esta tesis, ha sido

publicado un trabajo donde se demuestra que uno de estos genes es el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 1 (NCX1) (Formisano et al., 2012). Este canal está implicado en la fisiopatología del infarto (Boscia et al., 2006) y uno de los mecanismos más importantes mediante el cual se regula se realiza a través del represor REST y de su unión a un elemento RE1 en su promotor, como observamos nosotros en esta tesis para GluN1. Además, para llevarse a cabo dicha regulación, es necesario el reclutamiento de CoREST y HDAC2, en caso de GluN1 hemos observado que es necesario el reclutamiento de HDAC1. Y además, la sobre-expresión de REST causa una reducción de la actividad y la expresión de NCX1, al igual que ocurre con GluN1 según nuestros resultados de actividad de promotor. Como podemos ver, parece que la regulación de NCX1 y de GluN1, a través de REST, tiene lugar por mecanismos en paralelo, lo que no descarta que otros genes neuronales sigan el mismo patrón de regulación. Por otro lado, una publicación muy reciente del grupo de la Dra. Zukin demuestra un nuevo papel de REST en el *switch* entre GluN2B y GluN2A durante el desarrollo de los NMDARs sinápticos (Rodenas-Ruano et al., 2012). Según sus resultados, REST se activaría durante un periodo concreto de tiempo durante el desarrollo embrionario, y participaría mediante mecanismos de tipo epigenético en la represión de la expresión de *glun2b*, alterando las propiedades del NMDAR en las sinapsis de las neuronas de hipocampo de rata. Además, estos resultados se reproducen en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral. Sin embargo, estos resultados no los observan para *glun1*. Respecto a este hecho, nuestros resultados en cultivos de neuronas corticales no estarían a favor de lo observado por este grupo, ya que en nuestro caso REST sí estaría implicado en la regulación de GluN1 debido a una re-expresión de este represor en excitotoxicidad. Además, nosotros planteamos la hipótesis de que esta regulación sobre GluN1, no sólo sea durante un periodo concreto de tiempo como ocurre con GluN2B (Rodenas-Ruano et al., 2012), sino que este siempre presente en la regulación tanto basal como en excitotoxicidad y tanto en etapas del desarrollo como en neuronas adultas.

Hemos podido comprobar como los promotores de los genes que tienen en sus secuencias elementos de unión para CREB y MEF2 van a estar regulados negativamente por REST. Usando un RNA interferente de este represor, promotores canónicos formados por elementos de respuesta MEF2 y CREs exclusivamente, responden aumentando su actividad luciferasa en condiciones basales y recuperándola en excitotoxicidad. Como era de esperar, por los resultados previos, hemos demostrado el mismo resultado sobre el promotor de *glun1*, que ya sabíamos, por datos previos de esta tesis, que se regulaba a través de algunos de sus elementos MEF2 y CRE en su promotor (**Fig. 22C**). Además, los datos de la **figura 22B** usando el promotor de *glun1* cuádruple mutante corroboran la participación de estos sitios, (MEF2 (-812/-789) y (-2363/-2341) y CRE (-344/296)), aunque no descarta otros, en la regulación de *glun1* mediada por REST.

Hemos obtenido más resultados que están a favor de la represión que ejerce REST sobre GluN1, así por ejemplo, la sobre-expresión de este represor regula negativamente GluN1 tanto en

condiciones basales como en excitotoxicidad (**Fig. 22A**). Además, hemos demostrado que los extremos N- y C- terminales de REST, por los que se une a algunos represores como Co-REST y mSin3A reclutando a su vez a HDAC1 y 2 (Ballas et al., 2001; Huang et al., 1999; Naruse et al., 1999; You et al., 2001), son importantes para que REST pueda cumplir eficazmente su represión sobre la transcripción de GluN1 en condiciones basales, ya que como podemos ver en la **figura 22A**, la expresión de los mutantes de delección de REST da lugar a una disminución moderada de la actividad luciferasa del promotor GluN1, aunque no en la misma medida que cuando sobre-expresamos la forma completa (cREST). Además, en excitotoxicidad los niveles de actividad luciferasa fueron muy similares en las células transfectadas con pcDNA3 o con cualquiera de los cDNAs de REST, lo que nos indica que la re-expresión del represor endógeno es probablemente suficiente para bloquear al máximo la función del promotor proximal de GluN1. Con este resultado podemos destacar que REST va a regular negativamente genes neuronales con la ayuda de algunos co-represores, principalmente las HDACs, ya que se sabemos por la literatura que se van a unir a sus extremos N- y C- terminales. Estos resultados nos dan pie a pensar en un mecanismo de regulación epigenético combinado con la represión transcripcional ejercida por REST para regular genes entre los que se encuentra *glun1*.

Sobre cultivos primarios neuronales, hemos comprobado el efecto de algunos inhibidores generales de las HDACs de clase I y II, SAHA, TSA y butirato, que tienen propiedades neuroprotectoras, neurotróficas y antiinflamatorias y ya están en vías de pruebas clínicas (Chuang et al., 2009), con el fin de ver si se modificaba la actividad promotora de GluN1 en su presencia. Los resultados de la **figura 23C** así lo demuestran, existe un mecanismo de regulación negativa mediado por HDACs de clase I y II en excitotoxicidad mediante el cual al inhibir estas deacetilasas se recupera la actividad promotora de GluN1. Debido al resultado obtenido con estos inhibidores, decidimos estudiar más en detalle alguno de los tipos de HDACs. Decidimos estudiar HDAC4, ya que en la literatura se había puesto de manifiesto un posible mecanismo de regulación negativa de los factores MEF2 y, posiblemente CREB, inducido en condiciones de excitotoxicidad en neuronas ganglionares de cerebelo y mediado por HDAC4 (Bolger and Yao, 2005). Pero nuestros resultados no fueron los esperados y descartamos la participación de HDAC4 en la regulación de GluN1, ya que no observamos cambios significativos en la expresión de dicha deacetilasa en relación a los cambios observados para GluN1 (resultados no mostrados en esta tesis). En el desarrollo de este trabajo nos hemos interesado en caracterizar la expresión de otra deacetilasa muy importante implicada en procesos patológicos, HDAC1, ya que algunas publicaciones la resaltan como co-represor actuando junto con REST y reprimiendo genes neuronales como *glua2* (Noh et al., 2012). Hemos podido comprobar mediante fraccionamiento subcelular como existen dos bandas que reconoce su propio anticuerpo (**Fig. 24A**), la de mayor movilidad electroforética en el citoplasma, que se regula positivamente y la de menor movilidad en el núcleo que lo hace negativamente, durante la

excitotoxicidad. Quizá esta localización tenga relación con la secuencia de exporte nuclear que posee, de hecho el grupo de Kim y colaboradores destaca el aumento de la presencia de una forma de HDAC1 en el citosol en situación de daño axonal en procesos de esclerosis múltiple, demielinización o daño por excitotoxicidad en cultivos neuronales. Pero cabe destacar también que esta deacetilasa posee en su secuencia elementos NLS [revisado en (Morrison et al., 2007)] que la retienen en el núcleo donde realizaría su función como represora de los genes pro-supervivencia. Por tanto, y debido además al resultado obtenido en la **figura 24B** donde mostramos el aumento rápido, 2 min, que experimenta la forma citosólica de HDAC1, una posible explicación más plausible a estos resultados sería que, posiblemente HDAC1 este sufriendo algún tipo de modificación postraducciona. La mejor estudiada, según la revisión de Segré y Chiocca, sería la fosforilación a través de CKII o PKA, aunque no se podría descartar otro mecanismo como la acetilación o la sumoilación, ya que tanto HDAC1, como por ejemplo HDAC2, poseen en sus secuencias numerosos residuos susceptibles de dichas modificaciones. Además, está publicado que HDAC1 se defosforila, *in vitro*, por acción de la PP1 y λ -fosfatasa (Galasinski et al., 2002). La posible fosforilación de HDAC1 en excitotoxicidad, para dar respuesta a nuestros resultados, no ha sido estudiada en detalle en esta tesis, será un tema interesante a estudiar en el futuro, por ejemplo mediante ensayos de defosforilación *in vitro*.

Hemos estudiado más en detalle la participación de HDAC1 en la regulación de la transcripción de GluN1, ya que esta deacetilasa, parece jugar un papel fundamental en la regulación de este gen. Mediante el uso de un inhibidor específico de esta deacetilasa, MS-275, la actividad promotora de GluN1 aumenta en condiciones basales y se recupera en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. 25A**). Además, los datos obtenidos en presencia del RNA interferente para HDAC1 (**Fig. 25C**) y con un plásmido que contiene una secuencia concreta del cDNA de HDAC1 que sirve para sobre-expresar esta deacetilasa en nuestros cultivos (**Fig. 25D**), confirman que HDAC1 participa en la regulación del promotor de *glun1*. Esta deacetilasa, participa en dicha regulación inhibiendo la expresión de GluN1 tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad.

Además, hemos comprobado como promotores que tengan en sus secuencias elementos CREs o MEF2 y se regulen por estos FTs, entre los que se encuentra GluN1, pueden ser susceptibles de regularse por HDAC1. Este resultado lo podemos observar en la **figura 25B**, donde pCRE y pMEF, cuando está inhibida esta deacetilasa, aumentan su actividad luciferasa y se recuperan parcialmente en excitotoxicidad, no ocurriendo lo mismo con una forma mutada del promotor canónico MEF2, pmMEF2. Por tanto, existe una regulación negativa llevada a cabo por HDAC1 a través de sitios MEF2 y CRE.

El hecho de que REST y HDAC1 actúen de manera conjunta para regular el promotor de *glun1* de manera basal, lo hemos demostrado mediante el uso de plásmidos que contienen secuencias de

cDNA que permiten sobre-expresar ambos represores y RNAs interferentes comerciales para bloquear su actividad. En las **figuras 26A y 26C** podemos observar como en presencia de cualquiera de los RNAs interferentes, REST o HDAC1, y de los plásmidos que sobre-expresan estos represores, la actividad promotora de *GluN1* se ve aumentada, es decir que existe una represión mediada por estas proteínas y además REST no puede actuar sin HDAC1, mientras que HDAC1 podría tener algún efecto sobre los FTs independientemente del represor REST. Además, hemos demostrado que los elementos de respuesta MEF2 en posiciones (-812/-789) y (-2363/-2341) y CRE (-343/-324) y (-315/-296) del promotor de *glun1*, son necesarios para la regulación mediada por REST/HDAC1, ya que en ensayos de actividad luciferasa sobre las construcciones con los elementos delecionados y manteniendo HDAC1 interferida, la actividad se mantiene como en el control sin tratar (**Fig 26B**). Recordemos que previamente habíamos demostrado que interferir HDAC1 es suficiente para eliminar la actividad represora de REST, ya que cooperan en la represión génica.

A la vista de estos resultados, nos planteamos la hipótesis de la existencia de algún tipo de inmunocomplejo que englobara los FTs activadores, MEF2 y CREB, y proteínas represoras, HDAC1 y REST, y regulara el gen *glun1*. En este trabajo hemos sugerido la asociación entre la forma activa de CREB, MEF2 y HDAC1 principalmente en excitotoxicidad (**Fig. 27**), a pesar de que los niveles de pCREB son más bajos que en condiciones control. Existen datos en la literatura que demuestran la formación de complejos entre los FTs CREB y MEF2 con distintas clases de HDACs, lo que estaría a favor de nuestra observación. Por una parte, HDAC1 se asocia con CREB y bloquea su fosforilación a través de una interacción estable con PP1, y este complejo HDAC1/PP1 sería necesario en la fase de atenuación de la respuesta de CREB tras el tratamiento de células HEK293 con cAMP (Canettieri et al., 2003), y por otra parte, existe la formación de unos complejos de carácter inhibitorio en los que participaría HDAC4, PP1 α y MEF2A en neuronas de hipocampo regulando negativamente la transcripción de genes neuronales dependientes de MEF2 (Perry et al., 2009). En ambas publicaciones, ante distintos estímulos y en diferentes modelos, se forman unos complejos de carácter inhibitorio, a pesar de que estén formados por FTs activadores. Estos datos están a favor de nuestros resultados aunque no se hayan descrito en modelos de excitotoxicidad. Además, ambos trabajos nos sugieren la posibilidad de que PP1 pudiera estar participando en la formación de complejos para regular *GluN1*, ya que sabemos que participa activamente en la defosforilación de CREB y MEF2. La formación de este complejo en nuestro modelo podría ser un mecanismo neuroprotector frente a la excitotoxicidad, en el cuál la neurona por algún mecanismo desconocido enviaría una mayor cantidad de FTs activadores para regular al promotor, contrarrestando el efecto negativo ejercido por los represores. Estos resultados serán objeto de estudio en el futuro, ya que nos interesa conocer si existe alguna otra proteína que pueda estar implicada en la formación del

complejo mencionado, y el mecanismo exacto de actuación de éste, tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad.

Por otra parte, nuestros resultados han sugerido una posible participación de las HDACs de clase III, conocidas como sirtuinas (dependientes de NAD^+ e implicadas en el metabolismo celular), en la regulación de GluN1 en condiciones de excitotoxicidad, tanto su actividad promotora, como sus niveles de proteína (**Fig. 23A y B**). Además, los FTs que participan en la regulación de GluN1, CREB y MEF2, también se regulan por sirtuinas, ya que al inhibir estas deacetilasas con NAM, a determinadas dosis (5 y 10 mM), los niveles de proteína se recuperan casi en su totalidad (**Fig. 23B**). Como ya habíamos mencionado anteriormente, NAM es un inhibidor biológico muy potente y específico de esta familia de HDACs, que está bien caracterizado. El uso de este compuesto a la concentración de 10 mM recupera tanto los niveles de NAD^+ , previniendo la excitotoxicidad, como probablemente, la función de las sirtuinas (que necesitan NAD^+ para funcionar). Esta familia de HDACs tendría un efecto positivo sobre la expresión de GluN1, mientras que las de clase I y II lo tienen negativo, como vimos anteriormente. Esta interpretación concuerda con el papel protector de SIRT1 frente a la enfermedad de Huntinton y el efecto sobre la expresión de genes mediada por CREB (Jeong et al., 2012). El gen *glun1* esta regulado por CREB, y este FT se activa por TORC1 en cerebro. Este activador necesita deacetilarse por SIRT1 para poder unirse a CREB y así regular genes pro-supervivencia en la enfermedad de Huntinton, como *bdnf* (Jeong et al., 2012), por tanto es lógico pensar que pueda ser un mecanismo similar el que regule a *glun1*. A pesar de estos resultados, no hemos caracterizado cuál o cuáles de estas sirtuinas serían las que participarían en dicha regulación, en el futuro estudiaremos más en detalle la participación de estas deacetilasas en la regulación de la expresión de nuestro gen *glun1*, mediante el uso tanto de inhibidores, como de anticuerpos específicos para cada una de ellas, así como la posibilidad de que pudieran estar asociándose con otros FTs y así poder regular genes pro-supervivencia.

4. Regulación de GluN1, y de las proteínas MEF2, CREB y ERK5, por mecanismos no transcripcionales.

Aunque principalmente la regulación de GluN1 es por mecanismos transcripcionales o epigenéticos como hemos visto y analizado extensamente en esta tesis, existen componentes de regulación de este gen que implicarían procesos de procesamiento y fosforilación, entre otros, tanto de la propia subunidad (no estudiado en esta tesis), como de las proteínas que intervienen en su regulación.

Una conclusión importante de nuestros resultados es la participación de la fosfatasa PP1 en la regulación de GluN1 en excitotoxicidad, demostrado mediante la utilización del inhibidor AO a alta

concentración, 1 μ M, en experimentos de *immunoblot* (**Fig. 19A y B**) o ensayos de su actividad promotora (**Fig. 19C**). Esta fosfatasa, activada en el proceso de excitotoxicidad, es responsable de la defosforilación e inactivación de CREB que tiene lugar al sobre-activar NMDARs sinápticos y extrasinápticos (Sala et al., 2000). De hecho, en nuestro modelo de excitotoxicidad, la inactivación previa de PP1 reduce en gran medida la disminución inducida por NMDA en los niveles de CREB fosforilado (**Fig. 19A**), y podría explicar la recuperación en la transcripción del gen *glun1*. Además, el mecanismo de regulación de GluN1 es dependiente de la función de calpaína en excitotoxicidad, observado tanto en niveles de proteína (**Fig. 20B**) como en la actividad luciferasa de su promotor de 5'4 Kb (**Fig. 20C**) que, además, participa en la disminución de los niveles totales de CREB y pCREB inducida en excitotoxicidad (**Fig. 20B**). Una posibilidad es que las formas de CREB fosforiladas en el residuo de Ser 133 sean particularmente susceptibles al procesamiento por calpaína y no así aquellas con fosforilaciones adicionales y de menor movilidad electroforética, que serían las responsables de la regulación de GluN1. En excitotoxicidad, la activación de PP1 haría disminuir las formas hiperfosforiladas de CREB, y por tanto la expresión de GluN1, y la calpaína, activada tempranamente (**Fig.20**), procesaría las formas de CREB fosforiladas en el residuo de Ser 133 según se fuesen produciendo.

Por otra parte, hemos observado un procesamiento parcial de MEF2D por acción de la proteasa calpaína (**Fig. 20B**), sin embargo esta observación no es novedosa, ya que recientemente, y durante la escritura de esta tesis, se ha observado en neuronas corticales en un modelo de excitotoxicidad que la activación de los receptores extrasinápticos activa calpaína y esta es responsable del procesamiento de MEF2D que pierde su actividad de transactivación (Wei et al., 2012), con lo cual no le permitiría participar en la regulación de genes pro-supervivencia, como es el caso de *glun1*. Lo importante de nuestros resultados es que hemos demostrado que al igual que ocurre con MEF2D, MEF2A se estaría procesando por calpaína, y su recuperación sería prácticamente total en nuestros cultivos neuronales corticales en presencia de ambos inhibidores, Clp y CIII, en excitotoxicidad (**Fig. 20B**). Por tanto, estaríamos proponiendo un modelo cíclico en el cual la activación de los NMDARs extrasinápticos activarían calpaína, esta a su vez procesaría las formas A y D de MEF2 y las inactivaría impidiendo que entren al núcleo y que favorezcan la transcripción de la subunidad GluN1, o de otros genes pro-supervivencia. Además, existen datos que demuestran que el procesamiento de MEF2 no es exclusivo de calpaína sino que también intervienen las caspasas, de hecho la fosforilación de MEF2 por Cdk5 aumenta la susceptibilidad de este FT al corte por caspasas y con ello disminuyen sus efectos protectores en neuronas granulares de cerebelo en respuesta a concentraciones elevadas de glutamato (Tang et al., 2005). Ambos sistemas proteolíticos se activan en excitotoxicidad (Lau and Tymianski, 2010) sin embargo, en ambas publicaciones se llega a la conclusión de que la calpaína se activa antes que las caspasas, 30 min frente a 2 h, y en nuestro sistema está demostrado que la

calpaína se activa a tiempos muy tempranos de tratamiento con NMDA, incluso desde los 5 min (**Fig. 18C**). Durante el transcurso de esta tesis, realizamos algunas pruebas con inhibidores de caspasas, en concreto ZVAD, pero no llegamos a ninguna conclusión relevante, en todo caso observamos una protección parcial de GluN1 y CREB a tiempos largos, 6 h en presencia del inhibidor, pero no del todo clara (resultados no mostrados), quizá porque estas proteasas tardan más en activarse en nuestro sistema. En el futuro, analizaremos más en detalle la posible regulación por procesamiento a través de la activación de caspasas, de GluN1 y los FTs que a su vez lo regulan. Por tanto, como hemos visto anteriormente, tanto CREB como MEF2 siguen un patrón similar de regulación por calpaína, ambos se procesan y a su vez regulan nuestro gen de estudio *glun1*.

No existen datos en la literatura mediante los cuales se demuestre que la quinasa ERK5 se procese por calpaína o por caspasas en neuronas ni en ningún otro tipo celular, pero si que se sabe que en otros sistemas celulares como células HeLa o PC12 la adición de AO, inhibidor de PP1 y PP2A, bloquea la activación de ERK5 en respuesta a EGF o NGF y estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (Garcia et al., 2002). En nuestros cultivos primarios neuronales hemos observado como la adición de AO 1μM, que inhibe a PP1, activa a ERK5 en condiciones basales, pero se inhibe dicha activación en presencia de NMDA (**Fig. 19A**). Esto nos estaría indicando una situación en la cual en condiciones basales ERK5 no estaría fosforilada en los residuos Thr218/Tyr220 y por tanto no muy activa, debido al bloqueo ejercido por la PP1, y al inhibir a esta fosfatasa, ERK5 se activaría, en dichos residuos, pudiendo ser responsable de la activación de CREB, debido a los resultados de la **figura 19A**, y regularía positivamente GluN1. Por el contrario, en una situación de excitotoxicidad donde PP1 está muy activa, ERK5 estaría activa y en presencia de AO y NMDA se inactivaría y por tanto no podría ser la responsable del mantenimiento de la activación de CREB sugiriendo la participación de otras quinasas en la activación de CREB en excitotoxicidad. Por tanto, podemos sugerir que la PP1 tendría un doble papel en la regulación de ERK5, por una parte bloquearía su activación en condiciones basales, y por otra, favorecería su activación en condiciones de excitotoxicidad. Este hecho es contradictorio, pero podría explicarse de alguna manera si esta fosfatasa defosforilara distintos residuos de ERK5 dependiendo de si la célula está en situación basal o si está en un estado excitotóxico. En el futuro nos plantearemos estudiar más en detalle este posible papel dual de la fosfatasa PP1 en la regulación de ERK5.

Con los resultados obtenidos en esta tesis utilizando cultivos primarios neuronales corticales podemos proponer un modelo de regulación para GluN1 en dos situaciones diferentes: condiciones

basales y de excitotoxicidad por sobreactivación del NMDAR (Fig. 29). Los cultivos de neuronas disociadas preparados a partir de cortezas embrionarias son capaces de adquirir una morfología y polaridad propias de neuronas maduras y de formar sinapsis funcionales. Es por tanto de suponer que nuestros cultivos tienen un cierto nivel de actividad sináptica en condiciones basales, es decir, en los cultivos sin estimular. La activación de los NMDARs sinápticos daría lugar a la entrada de concentraciones moderadas del ion Ca^{2+} en las neuronas que activaría las vías de MAPKs y CaMKs, implicadas en la fosforilación de CREB [revisado en (Johannessen and Moens 2007)]. Además, los resultados obtenidos también sugieren que los cultivos primarios tienen BDNF en el medio de cultivo condicionado en condiciones basales, capaz de activar a los receptores TrkB, que activarían a su vez la vía MAPK: MEKK2/3-MEK5-ERK5. La quinasa ERK5 fosforilada, fosforilaría y activaría a su vez a MEF2 (Fig. 29A).

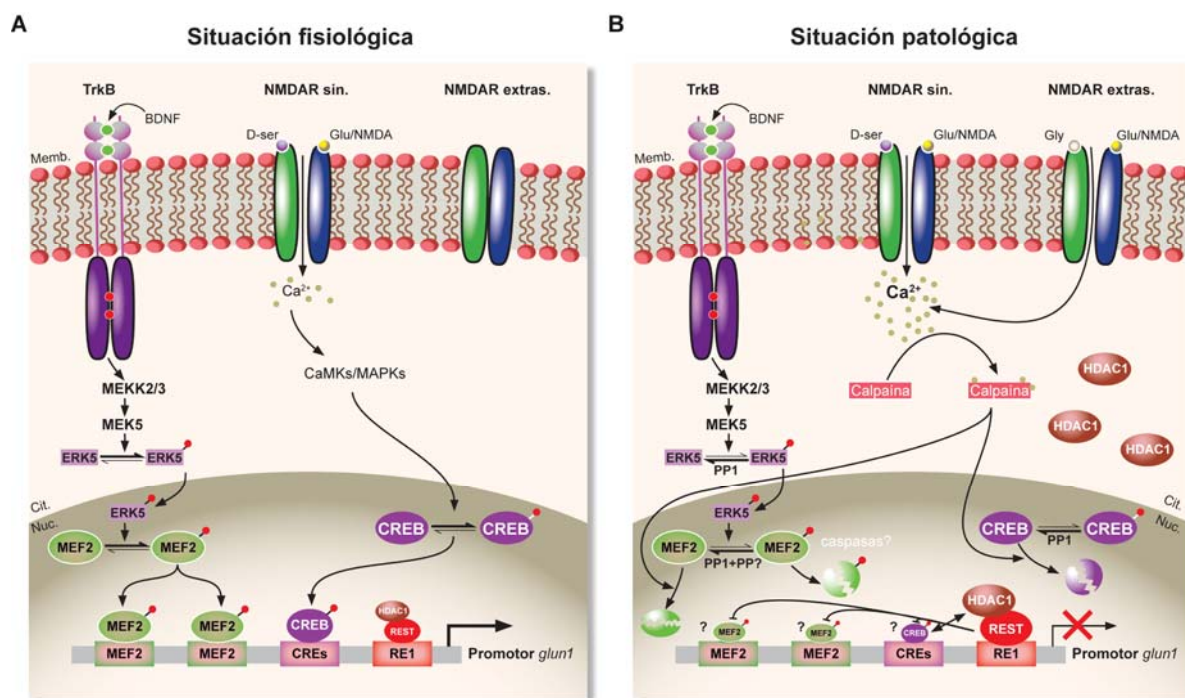


Figura 29. Modelo de la regulación de *glun1* y otras proteínas relevantes en su control transcripcional en situación fisiológica y de excitotoxicidad. **A)** En situación basal, los NMDARs sinápticos están activados funcionando como canales iónicos introduciendo concentraciones moderadas de Ca^{2+} al interior de las neuronas. Esta entrada produce la activación de MAPKs y CaMKs que a su vez fosforilan y activan al FT CREB. Por otra parte, el receptor TrkB se activa debido a la unión de BDNF a su región extracelular y, tras su fosforilación, produce la activación de la cascada de señalización de las MAPKs donde MEKK2/3 activa a MEK5 y esta a su vez fosforila y activa ERK5. Esta quinasa, fosforila y activa MEF2. No se descarta la activación adicional por BDNF de CREB a través de la activación de una vía alternativa MAPKs Ras/ERK (Kim et al., 2012). Tanto CREB como MEF2 activos, se unen a los elementos de respuesta indicados en el promotor de *glun1* favoreciendo su transcripción, a pesar de que REST y HDAC1 estén presentes y posicionados en el elemento RE1. **B)** En excitotoxicidad, la sobreactivación de NMDARs extrasinápticos junto con los sinápticos induce una entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas. Esto produce la activación de diversas fosfatasa, entre las que destacamos PP1, responsable de la defosforilación de pCREB, pMEF2 y pERK5, sin descartar la participación del resto. La activación de la proteasa Ca^{2+} -dependiente calpaina a tiempos más tardíos del proceso de excitotoxicidad da lugar al procesamiento de los FTs CREB, MEF2A y D. No descartamos la posible participación de las caspasas en la proteólisis de pMEF2. Por otro lado, se produce la re-expresión del represor REST, que necesita la función de HDAC1, cuya síntesis se induce en excitotoxicidad, para participar juntas en la represión del promotor de *glun1*. Sin embargo no descartamos que HDAC1, de manera individual, pueda asociarse y/o regular negativamente a los FTs CREB y MEF2. Resulta evidente la redundancia en los mecanismos de regulación negativa de las vías de supervivencia neuronal, inducidos por sobreactivación del NMDAR, que indicaría la gran relevancia funcional del silenciamiento de ciertas cascadas de señalización durante la excitotoxicidad. (Los círculos rojos indican fosforilaciones).

Otra posible explicación para la activación de MEF2 es la que expone el grupo de Lu y colaboradores en cardiomiocitos (Lu et al., 2000), donde MEF2 estaría reprimido por interacción de las HDACs de clase II. Cuando se activan las CaMKs, sugieren una fosforilación de las HDACs, que provocaría su unión a la chaperona 14-3-3 y serían exportadas del núcleo hacia el citoplasma [revisado en (McKinsey et al., 2002)]. El FT MEF2 quedaría libre para que, las CaMKs activaran a CBP y p300 (Chawla et al., 1998), y se unieran a MEF2 para favorecer la transcripción de genes. Tanto MEF2 como CREB fosforilados y activos, interaccionarían con los elementos de respuesta en el promotor de *glun1* existiendo una regulación positiva a través de los elementos de respuesta MEF2 (-812/-789) y (-2363/-2341) y CRE (-344/-296). Además, existiría una represión de la actividad promotora de *glun1* mediada por REST, posiblemente en presencia de HDAC1, a través de los elementos RE1 (-150/-131) y los elementos MEF2 y CREs anteriormente mencionados (**Fig. 29A**). Los resultados obtenidos en los experimentos de ChIP sugieren que de alguna forma CREB, está asociándose con los elementos de respuesta MEF2 (-812/-789) y (-2363/-2341) en el promotor de *glun1*, mientras que los resultados de las IPs sugieren que se podrían estar asociando los FTs pCREB, MEF2 y HDAC1 formando un complejo que regularía la expresión de *glun1*. El grupo de He y colaboradores desarrollan en su trabajo un modelo sobre la formación de un complejo llamado enhanceosoma, formado por la unión del co-activador p300 con varios FTs de tipo MEF2, concretamente 3, que reclutarían a su vez a la RNA polimerasa II y favorecerían la transcripción de diversos genes (He et al., 2011). Teniendo en cuenta esta idea, nuestra hipótesis sugeriría que los FTs CREB y MEF2 unidos a sus elementos anteriormente mencionados, podrían reclutar a CBP y/o p300 en condiciones basales (**Fig. 30A**), y formar un complejo de tipo enhanceosoma, que incluiría los FTs CREB, MEF2 y alguno de estos co-activadores, reclutando a su vez a la RNA polimerasa II necesaria para la transcripción de *glun1* (**Fig. 30B**).

En excitotoxicidad se nos plantean varias situaciones (**Fig. 29B**). Por una parte, continuando con la hipótesis del enhanceosoma, el promotor seguiría teniendo asociados los FTs MEF2 y CREB, pero en este caso p300, por algún mecanismo desconocido, dejaría de asociarse a estos FTs (**Fig. 30C**). En este momento, HDAC1 que se induce desde tiempos muy tempranos en excitotoxicidad, unida a REST que se re-expresa en estas condiciones y se posiciona en el elemento RE1 (-150/-131), se asociarían a MEF2 y pCREB, produciéndose la represión de la transcripción de *glun1* (**Fig. 29B y 30C**). Si esta teoría fuera cierta, estaríamos hablando de una re-expresión de FTs pro-muerte y no de una pérdida de función de FTs pro-supervivencia.

Por otra parte, los propios FTs y proteínas se regulan en excitotoxicidad. Durante este proceso, se activan los NMDARs extrasinápticos y como consecuencia de la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular, diversos mecanismos proteolíticos son activados, entre los que se incluye calpaína. Esta proteasa procesaría MEF2A, MEF2D (Wei et al., 2012), y CREB, posiblemente inactivándolos (**Fig. 29B**). Debido a este procesamiento, quizá los FTs no perderían su dominio de unión al DNA, pero si su

capacidad transactivadora y eso podría ser una posible explicación al resultado obtenido cuando, en presencia de los inhibidores de calpaína, el promotor de *glun1* recupera parcialmente su actividad (Fig. 20C).

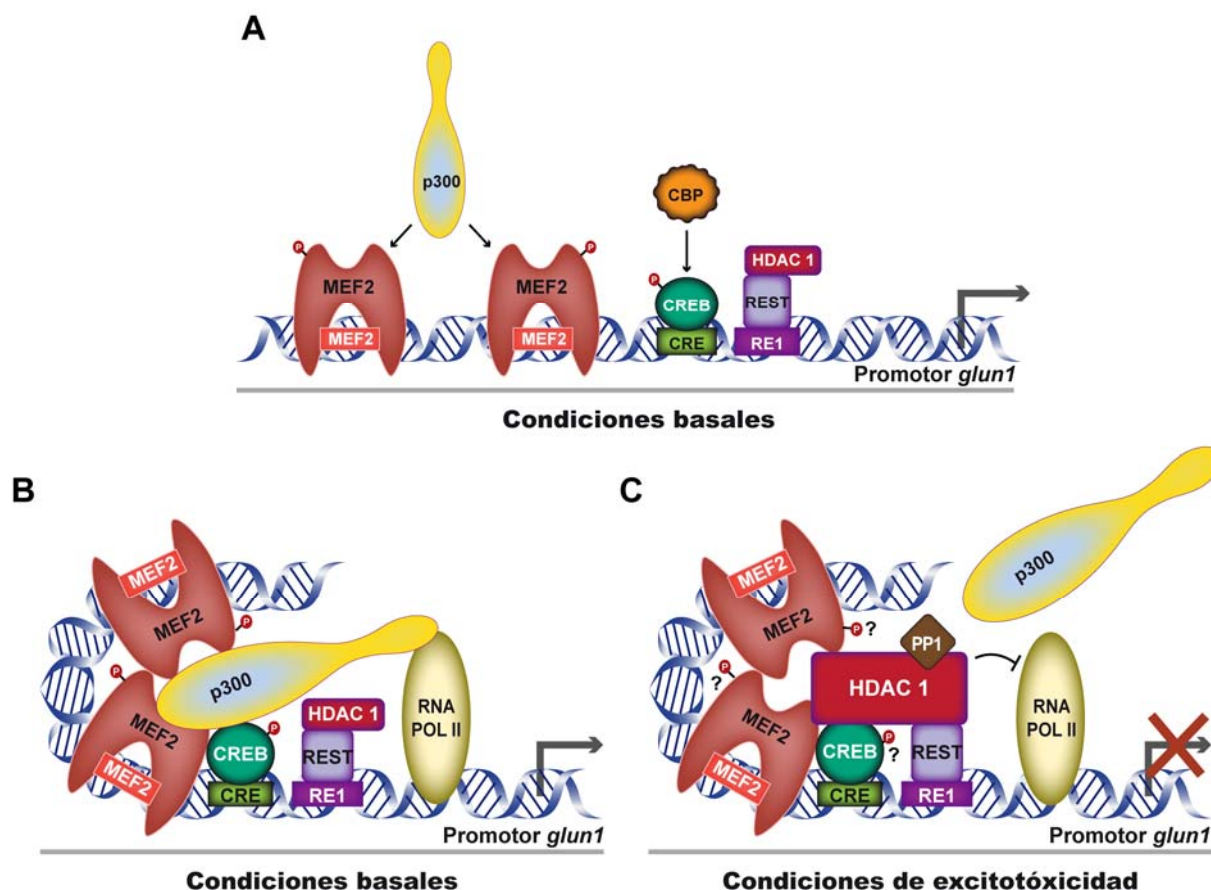


Figura 30. Modelo de la formación de un complejo proteína/DNA para la regulación el promotor de *glun1* en condiciones fisiológicas y de excitotoxicidad. A) En condiciones fisiológicas, los FTs MEF2 y CREB fosforilados y activos se unen a sus elementos de respuesta en el promotor del gen *glun1* para su activación, donde tiene gran importancia el reclutamiento de los co-activadores p300 y/o CBP por MEF2 y CREB, respectivamente, con el fin de favorecer la transcripción génica. Además, el represor REST, que recluta HDAC1 entre otras proteínas, estará unido a sus elementos RE1, regulando negativamente la transcripción. **B)** Modelo del enhanceosoma. También en condiciones basales, p300 se uniría a dos dímeros de MEF2 y a uno de pCREB, generando un complejo (enhanceosoma) que activaría a la RNA polimerasa II favoreciendo la transcripción de *glun1*, prevaleciendo sobre la represión ejercida por REST posicionado en su elemento RE1 junto con HDAC1. **C)** En condiciones de excitotoxicidad, por mecanismos desconocidos, se desacoplaría p300 del enhanceosoma. HDAC1, inducida muy rápidamente en este proceso y en colaboración con REST, podría pasar a formar parte de este complejo mediante su asociación con pCREB y MEF2, ya sea directa o indirectamente, e inhibir la RNA polimerasa II y así la transcripción de *glun1*. Además, la posible existencia de una asociación de HDAC1 con PP1 facilitaría la defosforilación de pCREB y pMEF2.

Además, la fosfatasa PP1 más activa en excitotoxicidad, por una parte defosforilaría e inhibiría la activación de ERK5, con lo que no podría activarse MEF2 a través de esa vía, y por otra inhibiría la fosforilación de CREB (Fig. 29B). Este FT, al no estar fosforilado, no estaría activo y, o bien no podría unirse al promotor de *glun1*, o se uniría, por los resultados obtenidos en el ChIP (Fig. 15B y C), pero

no podría favorecer la transcripción de *glun1*, siendo otra posible explicación para la recuperación de la actividad promotora de GluN1 en presencia de AO (**Fig. 19C**).

5. Regulación de GluN1, y las proteínas que participan en su regulación, en un modelo de isquemia focal por fototrombosis.

En el laboratorio ya se había demostrado anteriormente como en un modelo de isquemia focal transitoria ocluyendo la arteria cerebral media (MCAO), se perdían los niveles de GluN1 durante el proceso de excitotoxicidad inducido *in vivo* por el daño isquémico a 24 y 48 h (Gascon et al., 2005). Nosotros hemos mostrado en esta tesis los resultados preliminares de la regulación de GluN1 y de diferentes proteínas analizadas por *immunoblot* de muestras extraídas de un modelo de isquemia focal por fototrombosis (**Fig. 28**), modelo que estamos poniendo a punto en nuestro laboratorio. Efectivamente hemos comprobado que GluN1 se regula drástica y negativamente en la corteza ipsilateral a las 72 h posisquemia, en el caso del modelo de MCAO usado anteriormente, a 24 las horas ya existía una desaparición de los niveles de proteína GluN1, quizá porque el infarto producido con este modelo de fototrombosis sea más lento a la hora de activar los mecanismos de muerte que el modelo de MCAO. El resto de proteínas sigue más o menos el mismo patrón, pCREB se activa a tiempos de 2'5 h posisquemia mientras que a las 24 h sus niveles disminuyen drásticamente y por tanto, su activación. Este resultado no estaría muy a favor de nuestras observaciones *in vitro*, ya que en este caso CREB estaría inactivo mientras que los niveles de GluN1 se mantendrían elevados a las 24 h posisquemia. Un resultado similar obtenemos para los FTs MEF2A y MEF2D, disminución dramática de sus niveles a las 24 h post-isquemia, por tanto, no podrían estar regulando positivamente GluN1. Este resultado lo podríamos explicar de tal manera que si nos fijamos, todas las proteínas citadas son sustrato de calpaína y a 24 h la calpaína está muy activa en la corteza ipsilateral y puede ser la responsable de la pérdida de niveles y de actividad de dichos FTs durante la isquemia. Sin embargo, como resultado interesante, podemos destacar que HDAC1 aumenta sus niveles en las cortezas que han sufrido daño por isquemia cerebral tanto a 2'5, como a 24, como incluso a 72 h. Este resultado estaría a favor de la observación realizada anteriormente en los cultivos primarios en excitotoxicidad, donde demostramos por una parte que esta deacetilasa se expresaba en excitotoxicidad desde tiempos muy tempranos (**Fig. 24**) y además que existía una regulación negativa ejercida por este represor sobre GluN1 (**Fig. 25**).

Como ya hemos mencionado anteriormente, estos resultados son preliminares, y en el futuro profundizaremos en el estudio de la regulación de GluN1 y las proteínas que participan en su regulación, en el modelo de fototrombosis, analizando más en detalle distintos tiempos posisquemia, anteriores a 2'5 h y entre 24 y 72 h.

Como objetivos a largo plazo, y para continuar en la línea de investigación de esta tesis, una vez caracterizados algunos de los FTs que intervienen en la regulación de la transcripción del gen *glun1* tanto en condiciones basales como en excitotoxicidad, nos plantearemos, además de buscar y caracterizar otros FTs que puedan estar implicados en dicha regulación, identificar otros genes cuya expresión pudiese estar co-regulada por dichos FTs de la misma manera que la de *glun1*. Esto nos permitiría conocer mejor el proceso de excitotoxicidad, así como desarrollar herramientas terapéuticas para reducir el daño neuronal secundario que ocurre en isquemia cerebral.

CONCLUSIONES

1. La represión temprana de la expresión de la subunidad GluN1 del NMDAR inducida en condiciones de excitotoxicidad está mediada por dos elementos de respuesta MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y dos CREs (-343/-324 y -315/-296) de la región promotora proximal del gen *glun1* que también son necesarios para la activación del promotor por concentraciones sub-tóxicas de agonista, siendo este patrón de respuesta a la concentración de NMDA similar al de promotores CRE y MEF2 canónicos. Los elementos MEF2 y CRE parecen actuar de manera independiente en la activación del promotor, mientras que su represión en condiciones de excitotoxicidad ocurre por un mecanismo que requiere ambos tipos de elementos.
2. La quinasa ERK5, activada por la vía BDNF/TrkB y principalmente a través de los elementos MEF2 anteriores, tiene un papel central en la regulación de GluN1 tanto en condiciones basales como de excitotoxicidad. En estas últimas condiciones pERK5 es inactivada por la proteína-fosfatasa PP1, de manera similar a lo descrito para pCREB, y contribuye a la inhibición de la transcripción del gen *glun1* probablemente por la consiguiente pérdida de actividad de los FTs de la familia MEF2.
3. La fosfatasa PP1 participa en la inhibición de la expresión de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad mediante la inactivación de los FTs CREB y MEF2, aunque existen otros mecanismos independientes de la actividad de esta fosfatasa. Así por ejemplo, la proteasa calpaína también interviene en la inhibición de la expresión de *glun1* en etapas relativamente avanzadas del proceso de excitotoxicidad, mediante el procesamiento de los FTs MEF2A, MEF2D y CREB.
4. El represor REST, con la participación obligada de HDAC1, inhibe la actividad del promotor de *glun1* tanto en excitotoxicidad como de forma más atenuada en condiciones basales, principalmente a través de los elementos CRE y MEF2 anteriores y también de un motivo RE1 (-150/-131). Estos efectos concuerdan con el silenciamiento por REST de la actividad de promotores CRE o MEF2 canónicos.
5. Los niveles de HDAC1 aumentan desde tiempos muy tempranos de tratamiento con NMDA y esta proteína participa en la represión de *glun1* en condiciones basales y de excitotoxicidad mediante un mecanismo que requiere la presencia de REST, si bien no se descartan actividades de HDAC1 independientes de este represor.

Conclusiones

6. El tratamiento con nicotinamida para prevenir la inactivación de las sirtuínas originada por la disminución de los niveles de NAD^+ previsiblemente producida en condiciones de excitotoxicidad, es capaz de atenuar la inhibición de la expresión de GluN1 en un margen estrecho de concentraciones (5-10 mM), en paralelo al mantenimiento de la actividad de CREB y de los niveles de MEF2A y MEF2D.
7. Los FTs CREB y MEF2 se asocian entre sí por mecanismos desconocidos y reconocen las secuencias MEF2 (-812/-789 y -2363/-2341) y CRE (-343/-296) del promotor de *glun1*. Estos complejos DNA/proteína son favorecidos en condiciones de excitotoxicidad, situación en la que incorporan a la proteína HDAC1.
8. En un modelo de isquemia cerebral por fototrombosis se produce desde tiempos muy tempranos tras la inducción del daño un aumento notable de los niveles de la proteína HDAC1 en el tejido isquémico, que precede a la desaparición de los FTs CREB, MEF2A y MEF2D, y de la subunidad GluN1 del NMDAR.

BIBLIOGRAFÍA

- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347, 150-160.
- Akhtar, M.W., Kim, M.S., Adachi, M., Morris, M.J., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Kavalali, E.T., and Monteggia, L.M. (2012). In vivo analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival. *PLoS One* 7, e34863.
- Al-Mubarak, B., Soriano, F.X., and Hardingham, G.E. (2009). Synaptic NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis-acting FOXO binding site: FOXO1 is a FOXO target gene. *Channels (Austin)* 3, 233-238.
- Alberts, A.S., Montminy, M., Shenolikar, S., and Feramisco, J.R. (1994). Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 14, 4398-4407.
- Andres, M.E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson, M.E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., and Mandel, G. (1999). CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9873-9878.
- Annunziato, A.T., and Hansen, J.C. (2000). Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. *Gene Expr* 9, 37-61.
- Ao, H., Ko, S.W., and Zhuo, M. (2006). CREB activity maintains the survival of cingulate cortical pyramidal neurons in the adult mouse brain. *Mol Pain* 2, 15.
- Arevalo, J.C., Pereira, D.B., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2006). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 281, 1001-1007.
- Arevalo, J.C., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* 23, 2358-2368.
- Arzberger, T., Krampfl, K., Leimgruber, S., and Weindl, A. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 440-454.
- Awobuluyi, M., Lipton, S.A., and Sucher, N.J. (2003a). Translationally distinct populations of NMDA receptor subunit NR1 mRNA in the developing rat brain. *J Neurochem* 87, 1066-1075.
- Awobuluyi, M., Vazhappilly, R., and Sucher, N.J. (2003b). Translational activity of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 mRNA in PC12 cells. *Neurosignals* 12, 283-291.
- Bai, G., and Hoffman, P.W. (2009). Transcriptional Regulation of NMDA Receptor Expression.
- Bai, G., and Kusiak, J.W. (1993). Cloning and analysis of the 5' flanking sequence of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1) gene. *Biochim Biophys Acta* 1152, 197-200.
- Bai, G., and Kusiak, J.W. (1995). Functional analysis of the proximal 5'-flanking region of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene, NMDAR1. *J Biol Chem* 270, 7737-7744.
- Bai, G., and Kusiak, J.W. (1997). Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J Biol Chem* 272, 5936-5942.
- Bai, G., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y., and Hoffman, P.W. (2003). The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem* 86, 992-1005.
- Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M.E., Chenoweth, J., Anderson, M.E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J.R., Bowers, W.J., et al. (2001). Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31, 353-365.

Bibliografía

- Ballas, N., and Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 15, 500-506.
- Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefeuve, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275-285.
- Barbosa, A.C., Kim, M.S., Ertunc, M., Adachi, M., Nelson, E.D., McAnally, J., Richardson, J.A., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., Bassel-Duby, R., *et al.* (2008). MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9391-9396.
- Barco, A., Alarcon, J.M., and Kandel, E.R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108, 689-703.
- Barettino, D., Pombo, P.M., Espliguero, G., and Rodriguez-Pena, A. (1999). The mouse neurotrophin receptor *trkB* gene is transcribed from two different promoters. *Biochim Biophys Acta* 1446, 24-34.
- Bartsch, O., Schmidt, S., Richter, M., Morlot, S., Seemanova, E., Wiebe, G., and Rasi, S. (2005). DNA sequencing of CREBBP demonstrates mutations in 56% of patients with Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS) and in another patient with incomplete RSTS. *Hum Genet* 117, 485-493.
- Beal, M.F. (1992). Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* 2, 657-662.
- Beal, M.F. (1998). Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 44, S110-114.
- Belfield, J.L., Whittaker, C., Cader, M.Z., and Chawla, S. (2006). Differential effects of Ca^{2+} and cAMP on transcription mediated by MEF2D and cAMP-response element-binding protein in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281, 27724-27732.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14, 2919-2937.
- Bigge, C.F. (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 3, 441-447.
- Black, B.L., and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 167-196.
- Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., and Chatila, T.A. (2000). Ca^{2+} -dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 275, 197-209.
- Bolger, T.A., and Yao, T.P. (2005). Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J Neurosci* 25, 9544-9553.
- Bolton, M.M., Blanpied, T.A., and Ehlers, M.D. (2000). Localization and stabilization of ionotropic glutamate receptors at synapses. *Cell Mol Life Sci* 57, 1517-1525.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-7166.
- Boscia, F., Gala, R., Pignataro, G., de Bartolomeis, A., Cicale, M., Ambesi-Impiombato, A., Di Renzo, G., and Annunziato, L. (2006). Permanent focal brain ischemia induces isoform-dependent changes in the pattern of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger gene expression in the ischemic core, periinfarct area, and intact brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 502-517.

- Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
- Bradley, J., Carter, S.R., Rao, V.R., Wang, J., and Finkbeiner, S. (2006). Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci* 26, 1065-1076.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., *et al.* (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.
- Broide, R.S., Redwine, J.M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F.E., and Winrow, C.J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci* 31, 47-58.
- Buschbeck, M., and Ullrich, A. (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* 280, 2659-2667.
- Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., and Duarte, C.B. (2007). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 35, 208-219.
- Calderone, A., Jover, T., Noh, K.M., Tanaka, H., Yokota, H., Lin, Y., Grooms, S.Y., Regis, R., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2003). Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci* 23, 2112-2121.
- Canettieri, G., Morantte, I., Guzman, E., Asahara, H., Herzig, S., Anderson, S.D., Yates, J.R., 3rd, and Montminy, M. (2003). Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat Struct Biol* 10, 175-181.
- Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28, 436-445.
- Cathala, L., Misra, C., and Cull-Candy, S. (2000). Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 20, 5899-5905.
- Ciabarra, A.M., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S., and Sevarino, K.A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15, 6498-6508.
- Collingridge, G. (1987). Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330, 604-605.
- Collingridge, G.L., and Lester, R.A. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41, 143-210.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., and Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2-5.
- Conkright, M.D., Canettieri, G., Srean, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J.B., and Montminy, M. (2003). TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12, 413-423.
- Coyle, J.T., Tsai, G., and Goff, D. (2003). Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 318-327.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59-69.
- Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004, re16.

Bibliografía

- Cha-Molstad, H., Keller, D.M., Yochum, G.S., Impey, S., and Goodman, R.H. (2004). Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13572-13577.
- Chalovich, E.M., Zhu, J.H., Caltagareone, J., Bowser, R., and Chu, C.T. (2006). Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. *J Biol Chem* *281*, 17870-17881.
- Chandler, L.J., Sutton, G., Dorairaj, N.R., and Norwood, D. (2001). N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* *276*, 2627-2636.
- Chawla, S., Hardingham, G.E., Quinn, D.R., and Bading, H. (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* *281*, 1505-1509.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F.J., Huang, C.L., and Bading, H. (2003). Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem* *85*, 151-159.
- Chazot, P.L., and Stephenson, F.A. (1997). Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *J Neurochem* *68*, 507-516.
- Chen, H.S., and Lipton, S.A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* *97*, 1611-1626.
- Chen, S.D., Lin, T.K., Yang, D.I., Lee, S.Y., Shaw, F.Z., Liou, C.W., and Chuang, Y.C. (2010). Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptors gamma coactivator-1alpha against neuronal cell death in the hippocampal CA1 subfield after transient global ischemia. *Journal of neuroscience research* *88*, 605-613.
- Chen, Y., Lee, W.H., and Chew, H.K. (1999). Emerging roles of BRCA1 in transcriptional regulation and DNA repair. *J Cell Physiol* *181*, 385-392.
- Chen, Z.F., Paquette, A.J., and Anderson, D.J. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet* *20*, 136-142.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* *1*, 623-634.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* *8*, 185-196.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* *7*, 357-368.
- Choi, D.W., and Rothman, S.M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* *13*, 171-182.
- Chuang, D.M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.J., and Chiu, C.T. (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* *32*, 591-601.
- Das, S., Sasaki, Y.F., Rothe, T., Premkumar, L.S., Takasu, M., Crandall, J.E., Dikkes, P., Conner, D.A., Rayudu, P.V., Cheung, W., *et al.* (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* *393*, 377-381.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* *370*, 737-749.
- Deisseroth, K., Heist, E.K., and Tsien, R.W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* *392*, 198-202.

- Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T., and Rodriguez-Pena, A. (2004). Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 26, 470-480.
- Dharap, A., Bowen, K., Place, R., Li, L.C., and Vemuganti, R. (2009). Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 675-687.
- Dieterich, D.C., Karpova, A., Mikhaylova, M., Zdobnova, I., Konig, I., Landwehr, M., Kreutz, M., Smalla, K.H., Richter, K., Landgraf, P., *et al.* (2008). Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol* 6, e34.
- Ding, N., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Boyer, T.G. (2009). MED19 and MED26 are synergistic functional targets of the RE1 silencing transcription factor in epigenetic silencing of neuronal gene expression. *J Biol Chem* 284, 2648-2656.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., and Greenberg, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294, 333-339.
- Ehlers, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J., and Huganir, R.L. (1998). Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18, 720-730.
- Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., and Huganir, R.L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84, 745-755.
- Endres, M., Meisel, A., Biniszkievicz, D., Namura, S., Prass, K., Ruscher, K., Lipski, A., Jaenisch, R., Moskowitz, M.A., and Dirnagl, U. (2000). DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. *J Neurosci* 20, 3175-3181.
- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., and Moskowitz, M.A. (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 238-247.
- Faraco, G., Pancani, T., Formentini, L., Mascagni, P., Fossati, G., Leoni, F., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2006). Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol* 70, 1876-1884.
- Felinski, E.A., and Quinn, P.G. (2001). The coactivator dTAF(II)110/hTAF(II)135 is sufficient to recruit a polymerase complex and activate basal transcription mediated by CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13078-13083.
- Feng, Y., Paul, I.A., and LeBlanc, M.H. (2006). Nicotinamide reduces hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. *Brain Res Bull* 69, 117-122.
- Ferreira, J.S., Rooyackers, A., She, K., Ribeiro, L., Carvalho, A.L., and Craig, A.M. (2011). Activity and protein kinase C regulate synaptic accumulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors independently of GluN1 splice variant. *J Biol Chem* 286, 28331-28342.
- Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Endres, M., Ma, J., Dalkara, T., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1071-1076.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193.

Bibliografía

- Flavell, S.W., Cowan, C.W., Kim, T.K., Greer, P.L., Lin, Y., Paradis, S., Griffith, E.C., Hu, L.S., Chen, C., and Greenberg, M.E. (2006). Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* 311, 1008-1012.
- Flavell, S.W., Kim, T.K., Gray, J.M., Harmin, D.A., Hemberg, M., Hong, E.J., Markenscoff-Papadimitriou, E., Bear, D.M., and Greenberg, M.E. (2008). Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60, 1022-1038.
- Formisano, L., Guida, N., Valsecchi, V., Pignataro, G., Vinciguerra, A., Pannaccione, A., Secondo, A., Boscia, F., Molinaro, P., Sisalli, M.J., *et al.* (2012). NCX1 is a new rest target gene: Role in cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.*
- Formisano, L., Noh, K.M., Miyawaki, T., Mashiko, T., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2007). Ischemic insults promote epigenetic reprogramming of mu opioid receptor expression in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4170-4175.
- Galasinski, S.C., Resing, K.A., Goodrich, J.A., and Ahn, N.G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem* 277, 19618-19626.
- Gao, J., Wang, W.Y., Mao, Y.W., Graff, J., Guan, J.S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., and Tsai, L.H. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466, 1105-1109.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277, 25748-25755.
- Garcia, L., Garcia, F., Llorens, F., Unzeta, M., Itarte, E., and Gomez, N. (2002). PP1/PP2A phosphatases inhibitors okadaic acid and calyculin A block ERK5 activation by growth factors and oxidative stress. *FEBS Lett* 523, 90-94.
- Garriga-Canut, M., Schoenike, B., Qazi, R., Bergendahl, K., Daley, T.J., Pfender, R.M., Morrison, J.F., Ockuly, J., Stafstrom, C., Sutula, T., *et al.* (2006). 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci* 9, 1382-1387.
- Gascon, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Roda, J.M., Renart, J., Rodriguez-Pena, A., and Diaz-Guerra, M. (2005). Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem* 280, 35018-35027.
- Gascon, S., Paez-Gomez, J.A., Diaz-Guerra, M., Scheiffele, P., and Scholl, F.G. (2008). Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. *J Neurosci Methods* 168, 104-112.
- Gascon, S., Sobrado, M., Roda, J.M., Rodriguez-Pena, A., and Diaz-Guerra, M. (2008b). Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry* 13, 99-114.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, C., Kretz, O., Le Minh, N., Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H.W., and Schutz, G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34, 245-253.
- Gaudilliere, B., Shi, Y., and Bonni, A. (2002). RNA interference reveals a requirement for myocyte enhancer factor 2A in activity-dependent neuronal survival. *J Biol Chem* 277, 46442-46446.
- Gee, C.E., and Mansuy, I.M. (2005). Protein phosphatases and their potential implications in neuroprotective processes. *Cell Mol Life Sci* 62, 1120-1130.

- Ginty, D.D., and Segal, R.A. (2002). Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12, 268-274.
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23.
- Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L.A., Marshall, J., and Mao, Z. (2003). Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* 38, 33-46.
- Gonsette, R.E. (2008). Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 274, 48-53.
- Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.
- Graff, J., Rei, D., Guan, J.S., Wang, W.Y., Seo, J., Hennig, K.M., Nieland, T.J., Fass, D.M., Kao, P.F., Kahn, M., *et al.* (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 483, 222-226.
- Gregoire, S., Tremblay, A.M., Xiao, L., Yang, Q., Ma, K., Nie, J., Mao, Z., Wu, Z., Giguere, V., and Yang, X.J. (2006). Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281, 4423-4433.
- Grimes, J.A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry, D.L., Atouf, F., Holdener, B.C., Mandel, G., and Kouzarides, T. (2000). The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J Biol Chem* 275, 9461-9467.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., *et al.* (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55-60.
- Guardavaccaro, D., Frescas, D., Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Multani, A.S., Cardozo, T., Lasorella, A., Iavarone, A., Chang, S., Hernando, E., *et al.* (2008). Control of chromosome stability by the beta-TrCP-REST-Mad2 axis. *Nature* 452, 365-369.
- Haigis, M.C., and Guarente, L.P. (2006). Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20, 2913-2921.
- Hajimohammadreza, I., Raser, K.J., Nath, R., Nadimpalli, R., Scott, M., and Wang, K.K. (1997). Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *J Neurochem* 69, 1006-1013.
- Hall, R.A., and Soderling, T.R. (1997). Differential surface expression and phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2 in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 272, 4135-4140.
- Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., and Ulevitch, R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296-299.
- Handschin, C. (2009). The biology of PGC-1alpha and its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 30, 322-329.
- Hardingham, G.E. (2006). Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 34, 936-938.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.

Bibliografía

- Hartley, D.M., Kurth, M.C., Bjerkness, L., Weiss, J.H., and Choi, D.W. (1993). Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* 13, 1993-2000.
- Hayashi, M., Kim, S.W., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Abel, E.D., Eliceiri, B., Yang, Y., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (2004). Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest* 113, 1138-1148.
- Hayashi, M., and Lee, J.D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 82, 800-808.
- He, J., Ye, J., Cai, Y., Riquelme, C., Liu, J.O., Liu, X., Han, A., and Chen, L. (2011). Structure of p300 bound to MEF2 on DNA reveals a mechanism of enhanceosome assembly. *Nucleic Acids Res* 39, 4464-4474.
- Heidenreich, K.A., and Linseman, D.A. (2004). Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival. *Mol Neurobiol* 29, 155-166.
- Henson, M.A., Roberts, A.C., Perez-Otano, I., and Philpot, B.D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91, 23-37.
- Hetman, M., and Kharebava, G. (2006). Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr Top Med Chem* 6, 787-799.
- Holmes, K.D., Mattar, P., Marsh, D.R., Jordan, V., Weaver, L.C., and Dekaban, G.A. (2002). The C-terminal C1 cassette of the N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit contains a bi-partite nuclear localization sequence. *J Neurochem* 81, 1152-1165.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17, 31-108.
- Hong, S.C., Lanzino, G., Goto, Y., Kang, S.K., Schottler, F., Kassell, N.F., and Lee, K.S. (1994a). Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res* 661, 43-50.
- Hong, S.C., Goto, Y., Lanzino, G., Soleau, S., Kassell, N.F., and Lee, K.S. (1994b). Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 25, 663-669.
- Hossmann, K.A. (1999). The hypoxic brain. Insights from ischemia research. *Adv Exp Med Biol* 474, 155-169.
- Hu, S.C., Chrivia, J., and Ghosh, A. (1999). Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron* 22, 799-808.
- Huang, Y., Myers, S.J., and Dingleline, R. (1999). Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci* 2, 867-872.
- Huh, K.H., and Wenthold, R.J. (1999). Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274, 151-157.
- Humphrey, G.W., Wang, Y., Russanova, V.R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y., and Howard, B.H. (2001). Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J Biol Chem* 276, 6817-6824.
- Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., and Grant, S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3, 661-669.
- Hynd, M.R., Scott, H.L., and Dodd, P.R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45, 583-595.

- Hyrz, K., Handran, S.D., Rothman, S.M., and Goldberg, M.P. (1997). Ionized intracellular calcium concentration predicts excitotoxic neuronal death: observations with low-affinity fluorescent calcium indicators. *J Neurosci* 17, 6669-6677.
- Ikonomidou, C., Stefovskaja, V., and Turski, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12885-12890.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1, 383-386.
- Impey, S., Smith, D.M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., and Storm, D.R. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1, 595-601.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., and Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 572, 789-798.
- Jeffrey, R.A., Ch'ng, T.H., O'Dell, T.J., and Martin, K.C. (2009). Activity-dependent anchoring of importin alpha at the synapse involves regulated binding to the cytoplasmic tail of the NR1-1a subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 29, 15613-15620.
- Jeong, H., Cohen, D.E., Cui, L., Supinski, A., Savas, J.N., Mazzulli, J.R., Yates, J.R., 3rd, Bordone, L., Guarente, L., and Krainc, D. (2012). Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med* 18, 159-165.
- Jeyaseelan, K., Lim, K.Y., and Armugam, A. (2008). MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 39, 959-966.
- Jiang, M., Wang, J., Fu, J., Du, L., Jeong, H., West, T., Xiang, L., Peng, Q., Hou, Z., Cai, H., *et al.* (2012). Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med* 18, 153-158.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., and Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* 16, 1211-1227.
- Johannessen, M., and Moens, U. (2007). Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front Biosci* 12, 1814-1832.
- Jones, K.A., and Baughman, R.W. (1991). Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron* 7, 593-603.
- Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 68, 1145-1155.
- Karagiannis, T.C., and Ververis, K. (2012). Potential of chromatin modifying compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 2.
- Kasler, H.G., Victoria, J., Duramad, O., and Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 20, 8382-8389.
- Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* 16, 7054-7066.
- Kato, Y., Zhao, M., Morikawa, A., Sugiyama, T., Chakravorty, D., Koide, N., Yoshida, T., Tapping, R.I., Yang, Y., Yokochi, T., *et al.* (2000). Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem* 275, 18534-18540.

Bibliografía

- Kemp, J.A., and McKernan, R.M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 *Suppl*, 1039-1042.
- Kim, C.S., Choi, H.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Lee, B.K., Law, P.Y., Wei, L.N., and Loh, H.H. (2006). Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene. *Nucleic Acids Res* 34, 6392-6403.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S., and Chuang, D.M. (2007). Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 892-901.
- Kim, J.H., Roberts, D.S., Hu, Y., Lau, G.C., Brooks-Kayal, A.R., Farb, D.H., and Russek, S.J. (2012). Brain-derived neurotrophic factor uses CREB and Egr3 to regulate NMDA receptor levels in cortical neurons. *J Neurochem* 120, 210-219.
- Kim, M.J., Dunah, A.W., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745-760.
- Kim, S.H., Lu, H.F., and Alano, C.C. (2011). Neuronal Sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture. *PLoS One* 6, e14731.
- Kindler, S., Dieterich, D.C., Schutt, J., Sahin, J., Karpova, A., Mikhaylova, M., Schob, C., Gundelfinger, E.D., Kreienkamp, H.J., and Kreutz, M.R. (2009). Dendritic mRNA targeting of Jacob and N-methyl-D-aspartate-induced nuclear translocation after calpain-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 284, 25431-25440.
- Kingsbury, T.J., Murray, P.D., Bambrick, L.L., and Krueger, B.K. (2003). Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons. *J Biol Chem* 278, 40744-40748.
- Knoepfler, P.S., and Eisenman, R.N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.
- Koh, J.Y., and Choi, D.W. (1988). Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci* 8, 2153-2163.
- Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., and Nishida, E. (2006). Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol* 26, 1679-1690.
- Kondoh, K., Torii, S., and Nishida, E. (2005). Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* 114, 86-91.
- Kong, H., Boulter, J., Weber, J.L., Lai, C., and Chao, M.V. (2001). An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21, 176-185.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Kornhauser, J.M., Cowan, C.W., Shaywitz, A.J., Dolmetsch, R.E., Griffith, E.C., Hu, L.S., Haddad, C., Xia, Z., and Greenberg, M.E. (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34, 221-233.
- Koutsilieri, E., and Riederer, P. (2007). Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 *Suppl* 3, S329-331.

- Krainc, D., Bai, G., Okamoto, S., Carles, M., Kusiak, J.W., Brent, R.N., and Lipton, S.A. (1998). Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* 273, 26218-26224.
- Kuner, T., Wollmuth, L.P., Karlin, A., Seeburg, P.H., and Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17, 343-352.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Warashina, M., Taira, K., and Gage, F.H. (2005). The NRSE smRNA specifies the fate of adult hippocampal neural stem cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 87-88.
- Langley, B., Brochier, C., and Riviello, M.A. (2009). Targeting histone deacetylases as a multifaceted approach to treat the diverse outcomes of stroke. *Stroke* 40, 2899-2905.
- Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460, 525-542.
- Lau, D., and Bading, H. (2009). Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Neurosci* 29, 4420-4429.
- Lau, G.C., Saha, S., Faris, R., and Russek, S.J. (2004). Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem* 88, 564-575.
- Laurie, D.J., and Seeburg, P.H. (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14, 3180-3194.
- Lee, J., Duan, W., and Mattson, M.P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82, 1367-1375.
- Lee, J.D., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 715-724.
- Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., and Tsai, L.H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.
- Leifer, D., Krainc, D., Yu, Y.T., McDermott, J., Breitbart, R.E., Heng, J., Neve, R.L., Kosofsky, B., Nadal-Ginard, B., and Lipton, S.A. (1993). MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1546-1550.
- Lemerrier, C., Verdel, A., Galloo, B., Curtet, S., Brocard, M.P., and Khochbin, S. (2000). mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *J Biol Chem* 275, 15594-15599.
- Leveille, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., and Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22, 4258-4271.
- Levenson, J.M., and Sweatt, J.D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6, 108-118.
- Levine, E.S., Crozier, R.A., Black, I.B., and Plummer, M.R. (1998). Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10235-10239.
- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T.H., and Raymond, L.A. (2002). Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 5, 833-834.

Bibliografía

- Li, J.H., Wang, Y.H., Wolfe, B.B., Krueger, K.E., Corsi, L., Stocca, G., and Vicini, S. (1998). Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 10, 1704-1715.
- Lin, S.Y., Wu, K., Levine, E.S., Mount, H.T., Suen, P.C., and Black, I.B. (1998). BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* 55, 20-27.
- Liu, A., Hoffman, P.W., Lu, W., and Bai, G. (2004a). NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 279, 17449-17458.
- Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., and Mattson, M.P. (2009). Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular Med* 11, 28-42.
- Liu, L., Cavanaugh, J.E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., and Xia, Z. (2003). ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8532-8537.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., and Wang, Y.T. (2004b). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021-1024.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Lonze, B.E., and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lopez-Menendez, C. (2009). Regulación de la proteína Kidins220/ARMS en la excitotoxicidad e isquemia cerebral: implicaciones en supervivencia neuronal. Tesis Doctoral. Madrid 2009.
- Lopez-Menendez, C., Gascon, S., Sobrado, M., Vidaurre, O.G., Higuero, A.M., Rodriguez-Pena, A., Iglesias, T., and Diaz-Guerra, M. (2009). Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways. *J Cell Sci* 122, 3554-3565.
- Lu, J., McKinsey, T.A., Nicol, R.L., and Olson, E.N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4070-4075.
- Lu, Q., Hutchins, A.E., Doyle, C.M., Lundblad, J.R., and Kwok, R.P. (2003). Acetylation of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) by CREB-binding protein enhances CREB-dependent transcription. *J Biol Chem* 278, 15727-15734.
- Lund, I.V., Hu, Y., Raol, Y.H., Benham, R.S., Faris, R., Russek, S.J., and Brooks-Kayal, A.R. (2008). BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* 1, ra9.
- Lunyak, V.V., and Rosenfeld, M.G. (2005). No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell* 121, 499-501.
- Luo, Y., Zhu, W., Jia, J., Zhang, C., and Xu, Y. (2009). NMDA receptor dependent PGC-1alpha up-regulation protects the cortical neuron against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury. *J Mol Neurosci* 39, 262-268.
- Luthi-Carter, R., Apostol, B.L., Dunah, A.W., DeJohn, M.M., Farrell, L.A., Bates, G.P., Young, A.B., Standaert, D.G., Thompson, L.M., and Cha, J.H. (2003). Complex alteration of NMDA receptors in

- transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 14, 624-636.
- Lyons, G.E., Micales, B.K., Schwarz, J., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Expression of *mef2* genes in the mouse central nervous system suggests a role in neuronal maturation. *J Neurosci* 15, 5727-5738.
- Ma, Q.L., Harris-White, M.E., Ubeda, O.J., Simmons, M., Beech, W., Lim, G.P., Teter, B., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2007). Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J Neurochem* 103, 1594-1607.
- Mabuchi, T., Kitagawa, K., Kuwabara, K., Takasawa, K., Ohtsuki, T., Xia, Z., Storm, D., Yanagihara, T., Hori, M., and Matsumoto, M. (2001). Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *J Neurosci* 21, 9204-9213.
- Mao, X., Moerman, A.M., and Barger, S.W. (2002). Neuronal kappa B-binding factors consist of Sp1-related proteins. Functional implications for autoregulation of N-methyl-D-aspartate receptor-1 expression. *J Biol Chem* 277, 44911-44919.
- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M., and Greenberg, M.E. (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286, 785-790.
- Mao, Z., and Wiedmann, M. (1999). Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 274, 31102-31107.
- Marks, P.A., Richon, V.M., and Rifkind, R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 92, 1210-1216.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 275, 10887-10892.
- Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N.D., Pahk, A.J., Fukuchi, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1999). A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55, 957-969.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C.S., Whitt, M.A., *et al.* (2001). Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 286, 263-275.
- Mauna, J.C., Miyamae, T., Pulli, B., and Thiels, E. (2010). Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus* 21, 1093-1104.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11, 497-504.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2002). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 27, 40-47.
- Melloni, E., and Pontremoli, S. (1989). The calpains. *Trends Neurosci* 12, 438-444.
- Meoni, P., Bunnemann, B.H., Kingsbury, A.E., Trist, D.G., and Bowery, N.G. (1999). NMDA NR1 subunit mRNA and glutamate NMDA-sensitive binding are differentially affected in the striatum and pre-frontal cortex of Parkinson's disease patients. *Neuropharmacology* 38, 625-633.

Bibliografía

- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mariani, J., Kosik, K.S., Mehler, M.F., and Mattick, J.S. (2008). Noncoding RNAs in Long-Term Memory Formation. *Neuroscientist* 14, 434-445.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10, 155-159.
- Michael, L.F., Asahara, H., Shulman, A.I., Kraus, W.L., and Montminy, M. (2000). The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 20, 1596-1603.
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54, 369-415.
- Michan, S., Li, Y., Chou, M.M., Parrella, E., Ge, H., Long, J.M., Allard, J.S., Lewis, K., Miller, M., Xu, W., *et al.* (2010). SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 30, 9695-9707.
- Mishizen-Eberz, A.J., Rissman, R.A., Carter, T.L., Ikonomic, M.D., Wolfe, B.B., and Armstrong, D.M. (2004). Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis* 15, 80-92.
- Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R., and Mori, N. (2005). Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J Neurosci* 25, 1826-1835.
- Mody, N., Campbell, D.G., Morrice, N., Pegg, M., and Cohen, P. (2003). An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem J* 372, 567-575.
- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75, 875-886.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125-1136.
- Montminy, M.R., and Bilezikjian, L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328, 175-178.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-1221.
- Mori, H., and Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.
- Mori, N., Schoenherr, C., Vandenberg, D.J., and Anderson, D.J. (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron* 9, 45-54.
- Morimoto, H., Kondoh, K., Nishimoto, S., Terasawa, K., and Nishida, E. (2007). Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem* 282, 35449-35456.

- Morrison, B.E., Majdzadeh, N., and D'Mello, S.R. (2007). Histone deacetylases: focus on the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 64, 2258-2269.
- Mouravlev, A., Young, D., and During, M.J. (2007). Phosphorylation-dependent degradation of transgenic CREB protein initiated by heterodimerization. *Brain Res* 1130, 31-37.
- Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A.C., Scott, D.B., and Ehlers, M.D. (2003). Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron* 40, 581-594.
- Mudo, G., Makela, J., Di Liberto, V., Tselykh, T.V., Olivieri, M., Piepponen, P., Eriksson, O., Malkia, A., Bonomo, A., Kairisalo, M., *et al.* (2012). Transgenic expression and activation of PGC-1alpha protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 69, 1153-1165.
- Nakayama, K., Nagase, H., Koh, C.S., and Ohkawara, T. (2011). gamma-Secretase-regulated mechanisms similar to notch signaling may play a role in signaling events, including APP signaling, which leads to Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 31, 887-900.
- Naruse, Y., Aoki, T., Kojima, T., and Mori, N. (1999). Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13691-13696.
- Naya, F.J., and Olson, E. (1999). MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11, 683-688.
- Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttman, R.P., and Siman, R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 278, 14162-14167.
- Niethammer, M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, R.J., Craig, A.M., and Sheng, M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 20, 693-707.
- Nishimoto, S., and Nishida, E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7, 782-786.
- Noh, K.M., Hwang, J.Y., Follenzi, A., Athanasiadou, R., Miyawaki, T., Grealley, J.M., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2012). Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E962-971.
- Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., *et al.* (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423-2428.
- Okabe, S., Miwa, A., and Okado, H. (1999). Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19, 7781-7792.
- Okamoto, S., Li, Z., Ju, C., Scholzke, M.N., Mathews, E., Cui, J., Salvesen, G.S., Bossy-Wetzel, E., and Lipton, S.A. (2002a). Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3974-3979.
- Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., and Lipton, S.A. (2002b). Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 89-96.
- Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203, 631-645.
- Ooi, L., and Wood, I.C. (2007). Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet* 8, 544-554.

Bibliografía

- Ooi, L., and Wood, I.C. (2008). Regulation of gene expression in the nervous system. *Biochem J* 414, 327-341.
- Orrenius, S., Ankarcrona, M., and Nicotera, P. (1996). Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol* 71, 137-149; discussion 149-151.
- Otto, S.J., McCorkle, S.R., Hover, J., Conaco, C., Han, J.J., Impey, S., Yochum, G.S., Dunn, J.J., Goodman, R.H., and Mandel, G. (2007). A new binding motif for the transcriptional repressor REST uncovers large gene networks devoted to neuronal functions. *J Neurosci* 27, 6729-6739.
- Paas, Y. (1998). The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci* 21, 117-125.
- Packer, A.N., Xing, Y., Harper, S.Q., Jones, L., and Davidson, B.L. (2008). The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 28, 14341-14346.
- Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M., and Timmusk, T. (1998). Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci* 18, 1280-1296.
- Papadia, S., Soriano, F.X., Leveille, F., Martel, M.A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., *et al.* (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11, 476-487.
- Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N.R., Bading, H., and Hardingham, G.E. (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25, 4279-4287.
- Papouin, T., Ladepeche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., and Oliet, S.H. (2012). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150, 633-646.
- Park, J.S., Bateman, M.C., and Goldberg, M.P. (1996). Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Dis* 3, 215-227.
- Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V.J., Evans, R., Koerber, S.C., Hoeger, C., and Montminy, M.R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16, 694-703.
- Parker, D., Jhala, U.S., Radhakrishnan, I., Yaffe, M.B., Reyes, C., Shulman, A.I., Cantley, L.C., Wright, P.E., and Montminy, M. (1998). Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol Cell* 2, 353-359.
- Pazin, M.J., and Kadonaga, J.T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-328.
- Pazyra-Murphy, M.F., Hans, A., Courchesne, S.L., Karch, C., Cosker, K.E., Heerssen, H.M., Watson, F.L., Kim, T., Greenberg, M.E., and Segal, R.A. (2009). A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w. *J Neurosci* 29, 6700-6709.
- Perez-Otano, I., and Ehlers, M.D. (2004). Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals* 13, 175-189.
- Perry, R.L., Yang, C., Soora, N., Salma, J., Marback, M., Naghibi, L., Ilyas, H., Chan, J., Gordon, J.W., and McDermott, J.C. (2009). Direct interaction between myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and protein phosphatase 1alpha represses MEF2-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 29, 3355-3366.
- Pitt, D., Werner, P., and Raine, C.S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6, 67-70.

- Plaisance, V., Niederhauser, G., Azzouz, F., Lenain, V., Haefliger, J.A., Waeber, G., and Abderrahmani, A. (2005). The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J Biol Chem* 280, 401-407.
- Pulipparacharuvil, S., Renthal, W., Hale, C.F., Taniguchi, M., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Sikder, D., Dewey, C.M., Davis, M.M., *et al.* (2008). Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 59, 621-633.
- Qin, W., Haroutunian, V., Katsel, P., Cardozo, C.P., Ho, L., Buxbaum, J.D., and Pasinetti, G.M. (2009). PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol* 66, 352-361.
- Qureshi, I.A., and Mehler, M.F. (2009). Regulation of non-coding RNA networks in the nervous system--what's the REST of the story? *Neurosci Lett* 466, 73-80.
- Rashidian, J., Iyirhiaro, G., Aleyasin, H., Rios, M., Vincent, I., Callaghan, S., Bland, R.J., Slack, R.S., During, M.J., and Park, D.S. (2005). Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14080-14085.
- Ren, M., Leng, Y., Jeong, M., Leeds, P.R., and Chuang, D.M. (2004). Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 89, 1358-1367.
- Roberts, A.C., Diez-Garcia, J., Rodriguez, R.M., Lopez, I.P., Lujan, R., Martinez-Turrillas, R., Pico, E., Henson, M.A., Bernardo, D.R., Jarrett, T.M., *et al.* (2009). Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63, 342-356.
- Rodenas-Ruano, A., Chavez, A.E., Cossio, M.J., Castillo, P.E., and Zukin, R.S. (2012). REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 15, 1382-1390.
- Roopra, A., Huang, Y., and Dingledine, R. (2001). Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv* 1, 219-228.
- Rose, K., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1993). Cytotoxicity in murine neocortical cell culture. *Methods Toxicol* 1A, 46-60.
- Rumbaugh, G., and Vicini, S. (1999). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 19, 10603-10610.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Sala, C., Rudolph-Correia, S., and Sheng, M. (2000). Developmentally regulated NMDA receptor-dependent dephosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20, 3529-3536.
- Salinska, E., Danysz, W., and Lazarewicz, J.W. (2005). The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43, 322-339.
- Sasaki, T., Takemori, H., Yagita, Y., Terasaki, Y., Uebi, T., Horike, N., Takagi, H., Susumu, T., Teraoka, H., Kusano, K., *et al.* (2011). SIK2 is a key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB. *Neuron* 69, 106-119.
- Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78, 3-13.

Bibliografía

- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C., and Ehlers, M.D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 21, 3063-3072.
- Screaton, R.A., Conkright, M.D., Katoh, Y., Best, J.L., Canettieri, G., Jeffries, S., Guzman, E., Niessen, S., Yates, J.R., 3rd, Takemori, H., *et al.* (2004). The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119, 61-74.
- Schoepp, D., Bockaert, J., and Sladeczek, F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 11, 508-515.
- Schorge, S., and Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23, 1151-1158.
- Schratt, G. (2009). Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. *Curr Opin Neurobiol* 19, 213-219.
- Schroeter, M., Jander, S., and Stoll, G. (2002). Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods* 117, 43-49.
- Schumacher, M.A., Goodman, R.H., and Brennan, R.G. (2000). The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem* 275, 35242-35247.
- Segre, C.V., and Chiocca, S. (2010). Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol* 2011, 690848.
- Shalizi, A., Gaudilliere, B., Yuan, Z., Stegmuller, J., Shirogane, T., Ge, Q., Tan, Y., Schulman, B., Harper, J.W., and Bonni, A. (2006). A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311, 1012-1017.
- Shalizi, A., Lehtinen, M., Gaudilliere, B., Donovan, N., Han, J., Konishi, Y., and Bonni, A. (2003). Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci* 23, 7326-7336.
- Shalizi, A.K., and Bonni, A. (2005). brawn for brains: the role of MEF2 proteins in the developing nervous system. *Curr Top Dev Biol* 69, 239-266.
- Sheng, M. (2001). The postsynaptic NMDA-receptor--PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain. *J Cell Sci* 114, 1251.
- Sheng, M., and Kim, M.J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., and Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20, 727-740.
- Shin, J.H., Ko, H.S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y.I., Pletinkova, O., Troconso, J.C., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 144, 689-702.
- Siman, R., and Noszek, J.C. (1988). Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1, 279-287.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., *et al.* (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.
- Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R.J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-898.

- Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Bredt, D.S., and Li, M. (1997). PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol* 15, 336-342.
- Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93, 649-660.
- Sugiyama, H., Ito, I., and Hirono, C. (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325, 531-533.
- Sun, P., Enslen, H., Myung, P.S., and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8, 2527-2539.
- Tabrizi, S.J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanman, J.W., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (1999). Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45, 25-32.
- Tang, X., Wang, X., Gong, X., Tong, M., Park, D., Xia, Z., and Mao, Z. (2005). Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 25, 4823-4834.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- Tapia-Ramirez, J., Eggen, B.J., Peral-Rubio, M.J., Toledo-Aral, J.J., and Mandel, G. (1997). A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1177-1182.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929-933.
- Tatake, R.J., O'Neill, M.M., Kennedy, C.A., Wayne, A.L., Jakes, S., Wu, D., Kugler, S.Z., Jr., Kashem, M.A., Kaplita, P., and Snow, R.J. (2008). Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 120-125.
- Taunton, J., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Tezuka, T., Umemori, H., Akiyama, T., Nakanishi, S., and Yamamoto, T. (1999). PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 435-440.
- Thiel, G., Greengard, P., and Sudhof, T.C. (1991). Characterization of tissue-specific transcription by the human synapsin I gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3431-3435.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., and Westbrook, G.L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95, 1727-1734.
- Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173-183.
- Thompson, K.R., Otis, K.O., Chen, D.Y., Zhao, Y., O'Dell, T.J., and Martin, K.C. (2004). Synapse to nucleus signaling during long-term synaptic plasticity; a role for the classical active nuclear import pathway. *Neuron* 44, 997-1009.
- Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K., and Huganir, R.L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364, 70-73.
- Valor, L.M., Jancic, D., Lujan, R., and Barco, A. (2010). Ultrastructural and transcriptional profiling of neuropathological misregulation of CREB function. *Cell Death Differ* 17, 1636-1644.

Bibliografía

- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., *et al.* (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27, 6128-6140.
- Vidaurre, O.G. (2011). Regulación de proteínas en la disyuntiva supervivencia/muerte neuronal en excitotoxicidad e isquemia cerebral: TrkB y PSD-95. Tesis Doctoral.UAM. Madrid 2011.
- Vidaurre, O.G., Gascon, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Cuadrado, E., Montaner, J., Rodriguez-Pena, A., and Diaz-Guerra, M. (2012). Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis* 3, e256.
- Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., and Lee, S.K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21, 744-749.
- Vosler, P.S., Brennan, C.S., and Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38, 78-100.
- Wadzinski, B.E., Wheat, W.H., Jaspers, S., Peruski, L.F., Jr., Lickteig, R.L., Johnson, G.L., and Klemm, D.J. (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13, 2822-2834.
- Wahl, A.S., Buchthal, B., Rode, F., Bomholt, S.F., Freitag, H.E., Hardingham, G.E., Ronn, L.C., and Bading, H. (2009). Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene *Clca1* via activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 158, 344-352.
- Wahlgren, N.G., and Ahmed, N. (2004). Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1, 153-166.
- Walton, M.R., and Dragunow, I. (2000). Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* 23, 48-53.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang Vol. 23, pp. 20-26. *Trends Neurosci* 23, 59.
- Wang, R.M., Yang, F., and Zhang, Y.X. (2006a). Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca²⁺ influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats. *Life Sci* 79, 1839-1846.
- Wang, R.M., Zhang, Q.G., Li, C.H., and Zhang, G.Y. (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 80, 391-399.
- Wang, R.M., Zhang, Q.G., Li, J., Yang, L.C., Yang, F., and Brann, D.W. (2009). The ERK5-MEF2C transcription factor pathway contributes to anti-apoptotic effect of cerebral ischemia preconditioning in the hippocampal CA1 region of rats. *Brain Res* 1255, 32-41.
- Wang, R.M., Zhang, Q.G., and Zhang, G.Y. (2004). Activation of ERK5 is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor and L-type voltage-gated calcium channel via Src involving oxidative stress after cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 357, 13-16.
- Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., Tempst, P., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., and Kurokawa, R. (2008). Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454, 126-130.
- Wang, Y., Su, B., and Xia, Z. (2006b). Brain-derived neurotrophic factor activates ERK5 in cortical neurons via a Rap1-MEKK2 signaling cascade. *J Biol Chem* 281, 35965-35974.

- Wang, Y.F., Tsirka, S.E., Strickland, S., Stieg, P.E., Soriano, S.G., and Lipton, S.A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4, 228-231.
- Wareski, P., Vaarmann, A., Choubey, V., Safiulina, D., Liiv, J., Kuum, M., and Kaasik, A. (2009). PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem* 284, 21379-21385.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., and Mishina, M. (1993). Distinct spatio-temporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 707, 463-466.
- Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M.Z., and Segal, R.A. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4, 981-988.
- Wechsler, A., and Teichberg, V.I. (1998). Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *Embo J* 17, 3931-3939.
- Wei, G., Yin, Y., Li, W., Bito, H., She, H., and Mao, Z. (2012). Calpain-mediated degradation of myocyte enhancer factor 2D contributes to excitotoxicity by activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 287, 5797-5805.
- Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W., Alto, N.M., Fraser, I.D., Langeberg, L.K., Sheng, M., and Scott, J.D. (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 285, 93-96.
- Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D., *et al.* (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 4, 349-362.
- Wo, Z.G., and Oswald, R.E. (1995). Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18, 161-168.
- Wolffe, A.P., and Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* 129, 102-122.
- Woronicz, J.D., Lina, A., Calnan, B.J., Szychowski, S., Cheng, L., and Winoto, A. (1995). Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 6364-6376.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., and Romano, L.A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20, 1377-1419.
- Wu, G.Y., Deisseroth, K., and Tsien, R.W. (2001a). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2808-2813.
- Wu, H., Rothermel, B., Kanatous, S., Rosenberg, P., Naya, F.J., Shelton, J.M., Hutcheson, K.A., DiMaio, J.M., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., *et al.* (2001b). Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J* 20, 6414-6423.
- Wu, H.Y., Tomizawa, K., and Matsui, H. (2007). Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med Okayama* 61, 123-137.
- Wu, J., and Xie, X. (2006). Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol* 7, R85.
- Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, W.H., 3rd, and Montminy, M.R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334, 494-498.

Bibliografía

- Yan, C., Luo, H., Lee, J.D., Abe, J., and Berk, B.C. (2001). Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 276, 10870-10878.
- Yang, C.C., Ornatsky, O.I., McDermott, J.C., Cruz, T.F., and Prody, C.A. (1998). Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* 26, 4771-4777.
- Yang, S.H., Galanis, A., and Sharrocks, A.D. (1999). Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol* 19, 4028-4038.
- Yang, T., and Sauve, A.A. (2006). NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J* 8, E632-643.
- Yang, X.C., Karschin, A., Labarca, C., Elroy-Stein, O., Moss, B., Davidson, N., and Lester, H.A. (1991). Expression of ion channels and receptors in *Xenopus* oocytes using vaccinia virus. *Faseb J* 5, 2209-2216.
- Yeh, S.H., Lin, C.H., and Gean, P.W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol Pharmacol* 65, 1286-1292.
- Yildirim, F., Gertz, K., Kronenberg, G., Harms, C., Fink, K.B., Meisel, A., and Endres, M. (2008). Inhibition of histone deacetylation protects wildtype but not gelsolin-deficient mice from ischemic brain injury. *Exp Neurol* 210, 531-542.
- Yoon, S.C., Ahn, Y.M., Jun, S.J., Kim, Y., Kang, U.G., Park, J.B., and Kim, Y.S. (2005). Region-specific phosphorylation of ERK5-MEF2C in the rat frontal cortex and hippocampus after electroconvulsive shock. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 749-753.
- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1454-1458.
- Youn, H.D., Chatila, T.A., and Liu, J.O. (2000). Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* 19, 4323-4331.
- Yu, Y.T., Breitbart, R.E., Smoot, L.B., Lee, Y., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1992). Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 6, 1783-1798.
- Zhang, S.J., Steijaert, M.N., Lau, D., Schutz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., and Bading, H. (2007). Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53, 549-562.
- Zhang, S.J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D.A., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P., and Bading, H. (2009). Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet* 5, e1000604.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V.V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E.N., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 19, 21-30.
- Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T.A., Evans, R.M., and Yao, T.P. (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25, 8456-8464.
- Zhou, G., Bao, Z.Q., and Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270, 12665-12669.
- Ziff, E.B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19, 1163-1174.
- Zimmer, M., Fink, T.M., Franke, Y., Lichter, P., and Spiess, J. (1995). Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 159, 219-223.

- Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., MacDonald, M., Fossale, E., Zeitlin, S., Buckley, N., *et al.* (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* 27, 6972-6983.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35, 76-83.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.
- Zukin, R.S., and Bennett, M.V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18, 306-313.